

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TARTU ÜLIKOOLI TEHNOLOOGIAINSTITUUT

**Optimeeritud laengu ja hüdrofoobsusega PepFect14 võimaldab parandada geenitransporti
ja vähendada kõrvaltoimeid**

Magistritöö

Biomeditsiin

40 EAP

Elin Madli Peets

Juhendajad PhD Kadi-Liis Veiman

PhD Kaido Kurrikoff

TARTU 2017

Infoleht

Optimeeritud laengu ja hüdrofoobsusega PepFect14 võimaldab parandada geenitransporti ja vähendada kõrvaltoimeid

Geeniteraapia on oluline meetod haiguste ravil, kuid selle suurimaks väljakutseks on nukleiinhapete toimetamine rakkudesse. Nukleiinhapete transportimiseks on loodud rakku sisenev peptiid PepFect14, mis moodustab nanopartikleid. Antud töös uuriti moodustunud partiklite füsikokeemilisi omadusi ning optimeeriti nende formulatsiooni, et vähendada *in vivo* kõrvaltoimeid. Lisaks sünteesiti PF14 analoogid, millel oli modifitseeritud summaarset laengut või hüdrofoobsust. Kombineerides suurenenud hüdrofoobsuse ja laenguga peptiid ning optimeeritud formulatsioon, saavutati kõrge geeniekspressioon kudedes ilma kõrvaltoimeteta.

Märksõnad: geeniinduktsioon, transfektsioon, rakku sisenevad peptiidid, nanopartiklid, mitte-kovalentsed kompleksid

CERCS kood: B220 - Geneetika, tsütogeneetika

Efficient gene induction with reduced toxicity *in vivo* can be achieved by charge and fatty acid modified PepFect14

Gene therapy is an important method for curing diseases, however its biggest challenge is nucleic acid delivery into cells. In order to transport nucleic acids cell-penetrating peptide PepFect 14 has been used which forms nanoparticles. In this thesis the physicochemical properties of the formed nanocomplexes were studied and the formulation of those particles was optimized in order to reduce *in vivo* side-effects. Secondly, a series of PF14 analogs were developed with altered charge and fatty acid content. With an optimal combination of overall charge and hydrophobicity in the peptide sequence and optimized formulations more efficient *in vivo* gene delivery can be achieved without side-effects.

Keywords: gene induction, transfection, cell-penetrating peptide, nanoparticles, non-covalent complexes

CERCS: B220 - genetics, cytogenetics

Sisukord

Infoleht	2
Sisukord	3
Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade.....	7
1.1 Geeniteraapia	7
1.1.2 Nukleiinhapete manustamisega seotud piirangud	7
1. 2. Transportvektorid	8
1.2.1 Viirusvektorid.....	8
1.2.2 Mitte-viraalsed vektorid	8
1.2.2.1 In vivo rakendamise barjäärid	9
1.2.2.2 Nanopartiklite füsikokeemilised omadused	10
1.2.2.3 Nanopartiklite füüsikaline kirjeldamine	10
1.2.2.4 Nanopartikli moodustumise hindamise meetodid.....	13
1.2.2.5 Katioonsed transportvektorid	15
1.3 Rakku sisenevad peptiidid	16
1.3.1 Seondumine lastmolekuliga	17
1.3.2 RSPde klassifikatsioon	18
1.3.3 Sisenemise mehhanismid	19
1.3.4 Selektiivne transport	20
1.3.5 Transportaan ja derivaadid	21
1.3.5.1 PepFect14	21
2. Eksperimentaalne osa.....	23
2.1 Töö eesmärgid.....	23
2.2 Materjalid ja metoodika	24
2.2.1 Peptiidi süntees	24
2.2.2 Komplekside moodustamine	24
2.2.3 Opsonisatsiooni hindamine	25
2.2.4 Vastupidavus ensümaatilisele lagundamisele	25
2.2.5 Komplekside pinnalaengu ja hüdrodünaamilise diameetri mõõtmine	25
2.2.6 Rakukultuur ja transfektsioon	25

2.2.7 Rakkude elumuse hindamine	26
2.2.8 Lutsiferaasi taseme kvantifitseerimine kudedest	26
2.3 Tulemused	28
2.3.1 Nanopartiklite füsikokeemiliste omaduste iseloomustamine.....	28
2.3.2 pDNA koguse optimeerimine in vitro	28
2.3.3 Uue formulatsiooni mõju in vivo	29
2.3.4 RSP modifikatsioonide mõju nanokomplekside füsikokeemilistele omadustele....	30
2.3.5 PF14 modifikatsioonide mõju komplekside stabiilsusele.....	32
2.3.6 RSP modifikatsioonide mõju transfektsioonile	33
2.3.7 RSP/pDNA komplekside transfektsioon in vivo tingimustes	35
Arutelu	37
Kokkuvõte	41
Summary.....	42
Tänuõnad.....	43
Kasutatud kirjanduse loetelu.....	44
Kasutatud veebiaadressid.....	50
Lihtlitsents	52

Kasutatud lühendid

AAV	adeno-assotsieerunud viirus (<i>adeno associated virus</i>)
AFM	aatomjõu mikroskoopia (<i>atomic-force microscopy</i>)
CHO	hiina hamstri munasarja rakud (<i>chinese hamster ovary cells</i>)
DLS	dünaamiline valguse hajumise (<i>dynamic light scattering</i>) meetod
EtBr	etiidiumbromiid
FBS	veise looteseerum (<i>fetal bovine serum</i>)
LD	laser difraktsiooni (<i>laser diffraction</i>) meetod
N/P	laengu suhe
NLS	tuuma lokaliseerumise signaal (<i>nuclear localization signal</i>)
pDNA	plasmiidne DNA
PEI	polüetüleenimiin (<i>polyethylenimine</i>)
PF14	PepFect14
PF3	PepFect3
RLU	suhteline valguse ühik (<i>relative light unit</i>)
RSP	rakku sisenev peptiid (<i>cell penetrating peptide</i>)
SCAR	püüdurretseptorid (<i>scavenger receptors</i>)
SDS-PAGE	naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiid geel
SEM	skaneeriv elektronmikroskoopia (<i>scanning electron microscopy</i>)
TEM	transmissioonelektronmikroskoopia (<i>transmission electron microscopy</i>)
TP	Transportaan
TP10	Transportaan10

Sissejuhatus

Geeniteraapia pakub erinevaid võimalusi haiguste raviks molekulaarsel tasemel. Viimase paarikümne aasta jooksul on toimunud valdkonna kiire areng ning geeniteraapial põhinevad ravimid on jõudnud ka kliinilistesse rakendustesse. Geeniteraapia üheks suurimaks väljakutseks võib pidada nukleiinhapete transporti sihtmärk rakkudesse.

Nukleiinhapped ei suuda läbida rakumembraani oma suhteliselt suure molekulmassi ja negatiivse laengu tõttu. Seetõttu on välja töötatud erinevaid transportvektoreid, mis on võimelised nukleiinhappe kondenseerima nanopartikliteks, kaitstes neid seeläbi lagundamise eest ning vahendama nende transporti rakusisestesse sihtmärk kohtadesse.

Üheks sellisteks vektorite klassiks on rakku sisenevad peptiidid (RSP), mis on 5-30 aminohappe pikkused peptiidsed järjestused. RSPd on suutelised seonduma nukleiinhapetega ning on võimelised transportima nukleiinhapetel põhinevaid biomolekule nii rakukultuuris kui loomudelites.

PepFect14 (PF14) on RSP, millega on eelnevalt näidatud efektiivset plasmiidse DNA (pDNA) transporti. Kuigi rakukultuuris on komplekside kasutamine ohutu ja loomudelites on saavutatud kõrged geeniekspressiooni tasemed, on siiski vaja optimeerida nanokomplekse ohutuma bioefekti saavutamiseks.

Antud töö eesmärk oli optimeerida PF14 ja pDNA doose kompleksides nii, et väheneks kõrvaltoimed, kuid säiliks bioaktiivsus. Lisaks optimeeriti PF14 summaarset laengut ja hüdfoobsust, et suurendada pDNA transporti. Töös esitatud katsed viidi läbi Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Geeniteraapia

Geeniteraapia põhineb nukleiinhapetel põhinevate biomolekulide abil haiguste ravimisel molekulaarsel tasemel. Sellised ravimolekulid võimaldavad kompenseerida vigast geeniekspressiooni või vaigistades kahjuliku valgus tootmist (Junquera ja Aicart, 2016). Geeniteraapia abil on võimalik ravida nii pärilikke kui ka omandatud haigusi (Wang ja Gao, 2014) ning mitmed kliinilised uuringud keskenduvad näiteks hemofiilia, immuunpuudulikkuse ja kasvaja raviks. Tänu molekulaarsebioloogia arengule ja Inimese Genoomi Projektile on identifitseeritud mitmeid haigusi põhjustavaid geene. Geeniteraapia abil on võimalik ravida hemofiiliat, lihasdüstroofiat või tsüstilist fibroosi asendades vigane geen. Lisaks on võimalik ravida kardiovaskulaarseid ja neuroloogilisi haigusi ning vähki toimetades rakkudesse nukleiinhappeid, mis mõjutaks geenide ekspressiooni. (Pack *et al.*, 2005). Selleks, et vajalikke biomolekule rakkudesse viia, on kasutusel transportvektoreid (Naldini, 2015).

1.1.2 Nukleiinhapete manustamisega seotud piirangud

Geeniteraapia väljakutseks kliinilises rakenduses on nukleiinhapete transport sihtmärkkudedesse ja -rakkudesse.

Nukleiinhapped on suure molekulmassiga negatiivselt laetud hüdrofiilsed molekulid, mis takistab neil iseeneslikult rakkudesse sisenemise. Raku membraan koosneb lipiididest kaksikkihist ning sellele annavad negatiivse laengu oligosahhariidid membraani pinnal (Beddoes *et al.*, 2015), mis limiteerivad negatiivselt laetud nukleiinhapete paiknemist rakumembraanile. Raku tsütosooli tihedus ja organellid vähendavad veelgi nukleiinhapete saadavust nende toimekohas (Wang *et al.*, 2012).

Teiseks, füsioloogilistes lahustes olevad nukleaaasid lagundavad rakuvälist katmata (*naked*) DNAd ja RNAd (Junquera ja Aicart, 2015). DNA poolväärtusaeg vereplasmas pärast intravenooset manustamist on kümme minutit (Yang *et al.*, 2014). Lisaks nukleaaaside vahendatud degradatsioonile toimub opsonisatsioon ja fagotsütoos. Veel on näidatud, et katmata DNA akumuleerub peamiselt maksa ja seal toimub pDNA lagundamine (Schlenk *et al.*, 2013)

Neid takistusi saab vältida kasutades transportvektoreid, mis võimaldavad efektiivsema nukleiinhappe jõudmise sihtmärk rakkudesse (Yin *et al.*, 2014).

1. 2. Transportvektorid

1.2.1 Viirusvektorid

Evolutsiooni käigus on viirustel arenenud välja mitmeid mehhanisme, mille abil rakkudesse siseneda ning säilitada enda geneetiline materjal ilma peremeesraku kaitsemehhanisme aktiveerimata (Lukashev ja Zamyatnin, 2016).

Geeniteraapia jaoks on loodud rekombinantseid viiruseid, kus on eemaldatud replikatsiooni ja patogeensust põhjustavad geenid ning kuhu on sisestatud terapeutiline geneetiline materjal. Viirusvektoritel on mahupiirang ning sisestatava nukleiinhappe suurus sõltub kasutatavast viirusvektorist. Lisaks sõltub viirusvektori valik sihtmärk rakust ning sõltuvalt vektorist võib toimuda nukleiinhappe genoomi integreerumine (Lukashev ja Zamyatnin, 2016, Vannucci *et al.*, 2013).

Adeno-assotsieerunud viirustel (AAV) põhinevad vektorid on ühed enim kasutatavad viirusvektorid, mida kasutatakse kliinilistes uuringutes, lisaks põhineb Glybera, esimene Euroopas heaks kiidetud geeniteraapia ravim, AAVI. (Kotterman ja Schaffer, 2014).

Kuigi viirusvektorid on efektiivsed nukleiinhapete transportijad, on nende suurimaks puuduseks võimaliku immuunvastuse tekkimine, mis võib tekkida korduval manustamisel. Lisaks on viraalsete vektorite valmistamine keerukas ja kulukas. Viiruse integreerumisel peremehe genoomi võib esineda onkogeenne aktivatsioon, samas ei ole võimalik transportida väga suuri nukleiinhappeid piiratud genoomi suuruse tõttu. Eriti just kliinilise ohutuse ja efektiivsuse suurendamise tõttu otsitakse aktiivselt alternatiivseid meetodeid viirusvektoritele (Stewart *et al.*, 2016).

1.2.2 Mitte-viraalsed vektorid

Mitte-viraalsed vektorid loodi alternatiiviks viraalsetele vektoritele, et vältida viirusvektorite puudusi (Yin *et al.*, 2014). Tihti on nende vektorite eelis odavam tootmine ja võimalus neid korduvalt manustada (Wang *et al.*, 2012). Lisaks on võimalik muuta vektorid koele või rakutüübile spetsiifiliseks lisades seonduvaid molekule, näiteks antikehasid, või muutes vektor keskkonnale reageerivaks (joonis 6) (Cheng *et al.*, 2012).

Mitte-viraalsed transportmeetodid saab jagada kaheks kargo transportimise järgi: füüsilised meetodid ja keemilised vektorid. Füüsiliste meetodite põhimõtteks on kasutada mehaanilist (geenipüss), ultraheli, elektroporatsioon, hüdrodünaamilist (süst) või laseripõhist energiat, et tekitada rakumembraani nõrgestatud kohad, mille kaudu saab transporditav materjal raku

siseneda (Ibraheem *et al.*, 2014). Füüsiliste meetodite eeliseks on geneetilise materjali toimetamine otse raku tsütoplasmasse, seega välditakse mitut barjääri nagu näiteks endosoomist põgenemist. Füüsiliste meetodite puuduseks on piiratud rakendatavus *in vivo*, DNA kiire lagundamine tsütoplasmas ja puudulik transport rakutuumas (Mehier-Humbert ja Guy, 2005).

Keemiliste vektorite peamine ülesanne on varjutada nukleiinhappe negatiivne laeng, pakkida see kompleksi ja seeläbi kaitsta nukleaaside lagundava toime eest. (Ibraheem *et al.*, 2014). Seega enamuse seda tüüpi vektoriseerimisi sisaldab endas nukleiinhappe kondenseerimist nanopartikliteks või laadimist (*loading*) nanopartiklite koosseisu. Enamus selliseid komplekse siseneb rakku endotsüütilise raja kaudu, mille algatamine sõltub rakupinnal olevate molekulide interaktsioonidest nanopartikliga. Interaktsioone mõjutavad komplekside füsikokeemilised omadused. Vähene vabanemine endosomaalsetest vesiikulitest on peamine piirang vektor-vahendatud geneetilise materjali transportimisel rakku. Transporditava materjali endosoomist vabastamiseks on kasutusel mitmeid erinevaid strateegiaid, seal hulgas endosoomi häirimine kas mööduva kahjustuse või vesiikuli lüüsi läbi. (Stewart *et al.*, 2016).

1.2.2.1 In vivo rakendamise barjäärid

Mitmete kudedeni on võimalik jõuda vaid süsteemse manustamise teel. Kui räägime nanopartiklitest, siis tuleb neil aga enne sihtmärk-rakuni jõudmist ületada mitmeid barjääre. Näiteks peab nanopartikkel vältima seerumivalkudega agregeerumist ja ensümaatilist lagundamist endogeensete nukleaaside poolt, fagotsütootimist ja neerude kaudu väljutamist ning maksas lagundamist. Fagotsüüdid on makrofaagid ja monotsüüdid, mis eemaldavad nanokomplekse ja võõrmolekule kehast. Molekulid, mis on suuremad kui 5 nm ei läbi iseeneslikult endoteeli (välja arvatud spetsiifilistes organites või haiguslike protsesside tagajärjel) ning jäävad vereringesse püsima, kuni nad eemaldatakse. Koed nagu maks ja põrn võimaldavad ka suuremate nanopartiklite läbimist ning sinna jäävad mitmed nanopartiklid pidama (Wang *et al.*, 2012).

Vereringest väljudes peab kompleks difundeeruma ekstratsellulaarses maatriksis, mis koosneb polüsahhariididest ja valkudest. See aeglustab nanopartiklite rakku sisenemist mis suurendab aega, mille jooksul makrofaagid võivad nanopartiklid ära tunda.

Endosoomi kaudu rakku sisenedes peavad nanopartiklid endosoomist põgenema enne kui need lagundatakse madala pH juures (Whitehead *et al.*, 2009). Sõltuvalt nukleiinhappest on

oluline, kuhu rakuruumi molekul jõuab. pDNA peab ekspresseerumiseks jõudma raku tuuma, mida ümbritseb tuumamembraan. Jagunevates rakkudes plasmamembraan laguneb ning pDNA on võimeline tuuma sisenema. Kuna tsütoplasmas on nukleiinhappeid lagundavaid nukleaase, jõuab vähem pDNA-d sihtkohta (Zhang *et al.*, 2012).

1.2.2.2 Nanopartiklite füsikokeemilised omadused

Mitteviraalne nukleiinhapete vektoriseerimine sisaldab endas enamasti nanopartiklite moodustamist ning nanopartiklite terapeutiline efektiivsus sõltub nende füsikokeemilistest omadustest. Peamised omadused bioloogilises süsteemis on suurus, pinna omadused ja kuju. Efektiivseks kasutamiseks soovitatakse nanopartikli suuruseks 10-200 nm. Väiksemad nanopartiklid eemaldatakse organismist kiiresti neerude kaudu, antud vahemikust suuremad nanopartiklid aktiveerivad aga suurema tõenäosusega makrofaage ning osakesed satuvad peamiselt maksa, kopsu ja põrna (Desai, 2012).

Lisaks suurusele mõjutab biodistributsiooni ja rakku sisenemist ka nanopartikli kuju, mis mõjutab nii retseptorite äratundmist ja seondumist kui ka läbi membraani difundeerumist. Erinevate meetodite abil on valmistatud sfäärilisi, pulga-, ketta, ellipsi-, silindri- ja kuubikujulisi nanopartiklid (Duan *et al.*, 2013).

Nanopartikli pinnalaeng võib olla nii positiivne, neutraalne või negatiivne. Positiivne laeng aitab tekitada elektrostaatilisi interaktsioone negatiivselt laetud rakumembraaniga. Samas põhjustavad positiivsed laengud bioloogilises keskkonnas valkude adsorbeerumise partikli pinnale, mis mõjutab partikli rakku sisenemist (Salatin *et al.*, 2015). Lisaks on näidatud, et positiivse laenguga partiklid põhjustavad rohkem kahjulikke kõrvaltoimeid (Beddoes *et al.*, 2015). Negatiivse laenguga nanopartiklid seonduvad raku katioonsete aladega (Duan *et al.*, 2013). Neutraalse laenguga nanopartiklid püsivad kauem vereringes, sest nende pinnale adsorbeerub vähem vere seerumi komponente, samuti esineb neil vähem interaktsioone raku pinnaga (Salatin *et al.*, 2015).

Samuti mõjutab nanopartikli rakkudesse sisenemist ja vereringes tsirkuleerimist osakese hüdrofoobsus. Kehas opsoniseeritakse aktiivsemalt hüdrofoobsetel molekulidel põhinevaid osakesi kui hüdrofiilseid (Duan *et al.*, 2013).

1.2.2.3 Nanopartiklite füüsikaline kirjeldamine

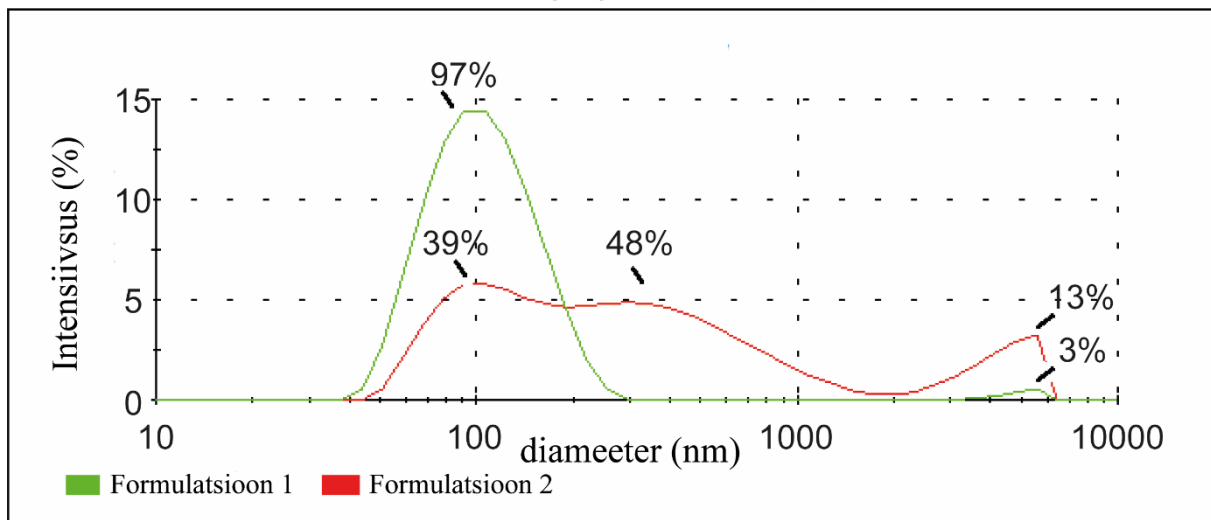
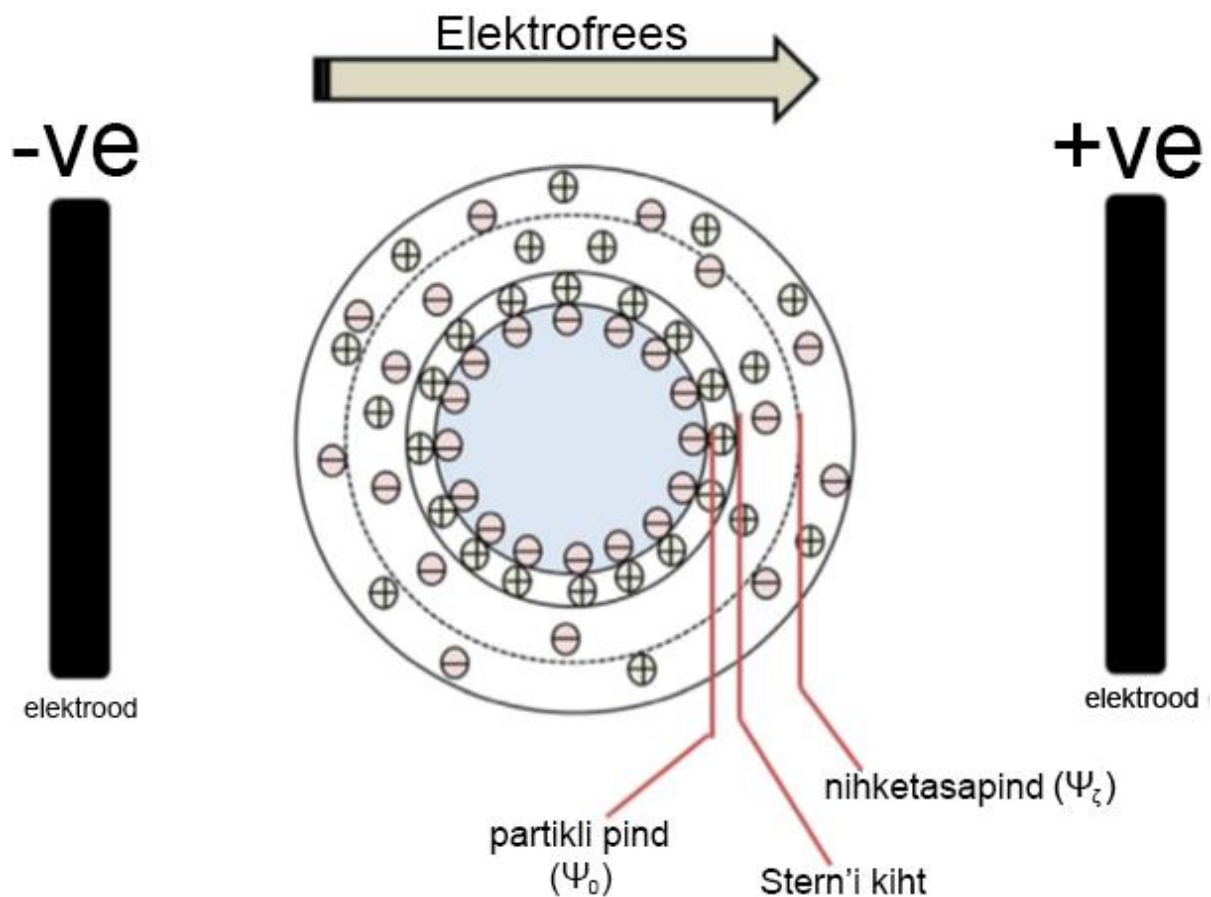
Nanopartiklite valmistamisel on oluline arvestada N/P suhet, mis näitab positiivselt laetud amiinrühmade arvulist suhet nukleiinhappe negatiivselt laetud fosfaatrühmaga partiklite

valmistamisel. N/P suhe võib mõjutada moodustunud kompleksi pinnalaengut, suurust ja stabiilsust. Kõrgete N/P suhete juures on enamasti saavutatud kõrgemat geeni ekspressiooni pDNA transpordi puhul, kuid sellega on kaasnenud rakkude elumuse langus *in vitro* ja kõrvaltoimed *in vivo* (Gary *et al.*, 2013).

Nanopartiklite füsikokeemilised omadused on olulised bioloogilise aktiivsuse jaoks ning nende kirjeldamiseks on kasutusel mitmeid meetodeid. Osakeste suuruse hindamiseks on kasutusel näiteks valguse hajumisel põhinevad meetodid, kuhu alla kuuluvad dünaamiline valguse hajumine (DLS) ja laser difraktsioon (LD). DLS mõõdab valguse intensiivsuse kõikumist ajas, kui osakesed on Browni liikumises. Valguse hajuvuse kõikumine on korrelatsioonis partiklite suurusega (Kathe *et al.*, 2014). Need meetodid ei mõõda otseselt osakese suurust vaid hindavad suurust proovist saadud andmete põhjal ning hinnangud toimuvad kindlatel eeldustel, näiteks et lahuses sisalduvad homogeense suurusega osakesed ja partiklid on sfäärilise kujuga. Seega kui lahus on heterogeenne ning esineb erineva suurusega partikleid ja/või agregaatide, siis mõjutab see saadavat tulemust (Gaumet *et al.*, 2008). Partiklite suurust mõjutab osakeste pinnale adsorbeerunud valkude kiht, mida nimetatakse valgu koroonaks. See koosneb „kõvast“ ja „pehmest“ kihist, millest esimene viitab sisemisele stabiilsele kihile, mis on tugevmaalt kinnitunud nanopartikli külge ja teine on erinevatest laengutest ja suurustest koosnev molekulide kiht, mis on suhteliselt lõdvalt kinnitunud „kõvale“ kihile (Beddoes *et al.*, 2015). Partikli hüdrodünaamiline raadius on hüpoteetilise kõva sfääri raadius, mis difundeerub samal kiirusel kui osakesed, mida hinnatakse DLS abil. Seega on hüdrodünaamiline raadius hüpoteetiline mõõt, lisaks on lahustes nanopartiklitele kinnitunud koroon (Bhattacharjee, 2016).

LD puhul mõõdetakse laseri valguse hajumist partiklitest, kus suuremad partiklid hajutavad valgust madalamatel nurkadel ja vastupidi. LD mõõdab täpsemini suuremaid osakesi võrreldes DLSga. LD vajab mõõtmiseks suurt kogust proovi, kuid on sobivam proovide jaoks, kus esineb ebapuhtusi (Bhattacharjee, 2016).

Zeta potentsiaal ehk elektrokiineetiline potentsiaal, on nanopartikli nihketasapinna potentsiaal elektriväljas. Laetud osakese pinnale adsorbeerub ionide ja vastasioonide topeltkiht, mida nimetatakse elektriliseks kaksikkihiks. Sisemine kiht koosneb partikli vastaslaenguga ionidest ja molekulidest ning seda nimetatakse Sterni kihiks. Sterni kihile tekib hajus kiht, mis koosneb sama ja vastaslaenguga ionidest. Elektriväljas liiguvad laetud nanopartiklid vastas elektroodi juurde ja toimub elektroforees (joonis 1) (Kaszuba *et al.*, 2010).



Joonis 1. A- Zeta potentsiaal. Negatiivselt laetud nanopartiklile tekib positiivsetest laengutest koosnev Sterni kiht, millele omakorda tekib hajus kiht (pole joonisele märgitud), kuhu kuuluvad nii positiivsed kui negatiivsed laengud. Elektroforeesi käigus liigub partikkel positiivse elektroodi juurde. (Bhattacharjee, 2016). B- DLS mõõtmised kahest erineval viisil kokku segatud RSP/pDNA kompleksidest. X teljel on kujutatud hüdrodünaamilist diameetrit, joontele on numbritena toodud erinevate suurusfraktsioonide osakaalud (autori joonis).

Zeta potentsiaali kasutatakse nanopartikli pinnalaengu hindamiseks. Nanopartikli zeta potentsiaali mõjutavad erinevad tegurid, näiteks pH langemisel tõuseb zeta potentsiaal ja pH

suurenemisel zeta potentsiaal väheneb. Ioonse jõu suurenemisel zeta potentsiaal väheneb. Lisaks on näidatud zeta potentsiaali muutust partiklite kontsentratsioonist sõltuvalt (Bhattacharjee, 2016).

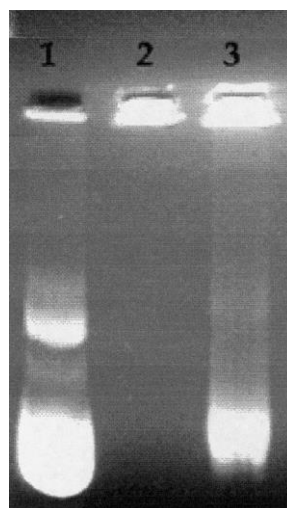
Nanopartiklite suuruse ja kuju kirjeldamiseks kasutatakse ka mikroskoopiat. Enim on kasutusel skaneeriv elektronmikroskoopia (SEM), mille abil saab 3D kujutisi ja transmissioonelektronmikroskoopia (TEM), mille abil saab kõrge resolutsiooniga kahemõõtmelisi kujutisi (Kathe *et al.*, 2014). Antud meetodite puhul on vajalik aga proovi ettevalmistus, mis võib mõjutada tekkivat proovi, sest proovi kuivamisel on vaja rakendada kõrget vaakumit, mis võib tekitada artefakte. Lisaks on vaja palju partikleid, et analüüsida saadud tulemusi (Treuel *et al.*, 2014). TEM tulemused ei ühti tihti ka DLS tulemustega, sest DLS mõõdab proove lahuses, kuid TEM mõõdab kuivi proove ja kuvab ala, millest elektronid on läbi läinud. Seetõttu saadakse DLS mõõtmisel tavaliselt suuremad partikli suurused kui TEM abil (Bhattacharjee, 2016).

Aatomjõu mikroskoopia (AFM) põhineb otsiku ja proovi vahel mõjuvate jõududel. AFM abil saadakse 3D kujutised kõrge resolutsiooniga, lisaks ei vaja proov temperatuuri ega rõhu muutmist ning mõõtmisi saab teha vedelikus, mistõttu jääb proovile alles nii struktuur kui funktsioon (Lamprecht *et al.*, 2014). AFM puuduseks on korraga vähese materjali uurimine ning aeglase skanneerimise juures võib tekkida termiline triiv, mille käigus proovi suurus muutub aeglaselt temperatuuri toimel (Kathe *et al.*, 2014).

1.2.2.4 Nanopartikli moodustumise hindamise meetodid

Nanopartikli komponentide omavahelise elektrostaatilise interaktsiooni hindamiseks kasutatakse geelelektroforeesil põhinevat mobiilsustesti (*gel shift assay*). See põhineb DNA mobiilsuse kadumisel, juhul kui DNA on seotud katioonse polümeeri või valguga. Mobiilsuse kadu võrreldakse seondamata DNA liikuvusega – erinevalt vabast DNAST ei suuda nanopartiklid liikuda läbi geeli ning jäävad geelihambasse pidama (joonis 2) (Lane *et al.*, 1992).

DNAGA interkaleeruvate fluorestsentsvärvide abil saab hinnata pDNA seondumise tugevust transportvektoriga ning nanokompleksi moodustumist. Etiidiumbromiid (EtBr) interkaleerub DNA kaksikheeliksis aluspaaride vahele ning põhjustab fluorestsentsi. Valminud kompleksi tugevusest sõltub mõõdetav fluorestsents – tugevamal pDNA seondumisel vektoriga seondub vähem EtBr pDNAGA ning fluorestsentsi on vähem (Xu ja Szoka, 1996).



Joonis 2. Geelektroforeesil põhinev mobiilsus test. 1. kaevu on kantud vaba pDNA, 2. kaevu on kantud pDNA seotud nanokompleksidesse põlu-(L)-lüsiiniga, 3. kaevu on kantud põlu-(L)-lüsiiniga seotud pDNA nanokompleksid, mida on eelnevalt töödeldud hepariiniga (Modifitseeritud Ramsay ja Gumbleton, 2001)

Nanopartiklitele kinnituvate seerum valkude hindamiseks kasutatakse naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiid geeli (SDS-PAGE). SDS-PAGE abil on võimalik lahutada erineva molekulmassiga valke, mistõttu on võimalik eristada nanopartiklile kinnitunud valgud (Jimenez *et al.*, 2016).

Hepariini teisaldamise testiga (*heparin displacement assay*) on võimalik hinnata transportvektori aviidsust nukleiinhappe suhtes (joonis 2). Hepariin sool on anioonne molekul, millel on tugevam seondumis afiinsus transportvektorite suhtes, kui nukleiinhapetel. Mida madalamal kontsentratsioonil suudab hepariin nukleiinhappe kompleksist välja tõrjuda, seda nõrgemad on interaktsioonid transportvektori ja nukleiinhappe vahel (Xu ja Szoka, 1996).

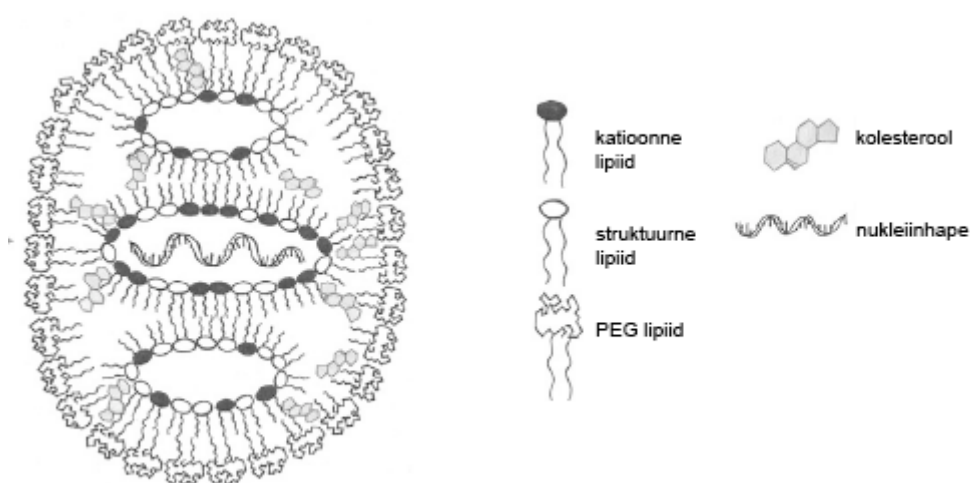
Kuigi on mitmeid meetodeid nanopartiklite füüsikalise-keemiliste omaduste kirjeldamiseks, siis antud tulemused üksi ei näita nanopartikli efektiivsust geeniteraapia läbiviimisel. Selleks tuleb hinnata nanopartiklite iseloomustamisel saadud numbrilisi väärtusi ning nende seost bioaktiivsusega *in vivo* tingimustes. Kahjuks ei ole täpselt teada, millised on vajalikud näitajad, et nanopartikkel sobiks geeniteraapia vektoriks ning *in vivo* sobilike omaduste saavutamisel esineb mitmeid vastuolulisi tingimusi. Näiteks tehakse nanopartiklite suuruse mõõtmised vesilahuses, kuid füsioloogilises keskkonnas adsorbeerub partiklile valgu koroona, mis suurendab partikli diameetrit ning varasem mõõtmine ei pruugi kajastada partikli reaalsust suurust bioloogiliselt relavantses keskkonnas. Lisaks on opsonisatsiooni vältimise jaoks vaja võimalikult neutraalset pinnalaengut, samas positiivse laengu korral interakteerub

nanopartikkel rakumembraaniga efektiivsemalt ning võimaldab rakku sisenemist. Samuti peab nanopartikkel olema vereplasmas stabiilne, kuid rakku sisenemisel dissotseeruma lastmolekulist, et see saaks vahendada terapeutilist toimet.

1.2.2.5 Katioonsed transportvektorid

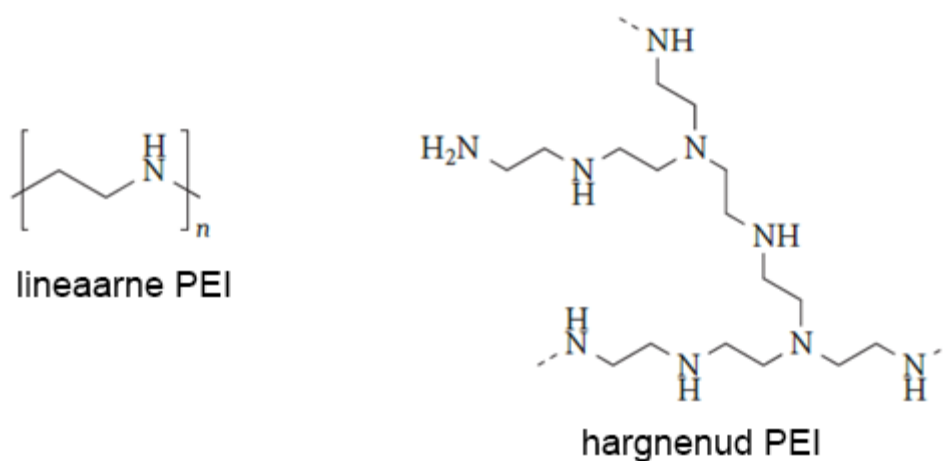
Enim kasutatud mitte-viraalseks transportvektoriks on lipiidised nanopartiklid. Liposoomidel põhinevad vektorid koosnevad katioonsest pearühmast ja hüdrofoobsest ankrust, mis koosneb kas kahest alifaatsest ahelast või kolesterooli derivaadist. Hüdrofiilset pea osa ja hüdrofoobset saba osa ühendab linker, millest sõltub moodustunud lipiidi biolagundatavus (Schlenk *et al.*, 2013). Liposoomid vastavad mitmetele nõuetele, mis on püstitatud väikeste molekulide transpordiks: tekkivad liposoomid on enamasti alla 100 nm suured, toimub efektiivne biomolekuli kapseldamine, robustne ja skaleeritav tootmine ning valminud saaduse stabiilsus. Geneetiliste ravimite transpordiks on võetud kasutusele ioniseeritavad katioonsed lipiidid, kus laadimine käib etanooli vahendusel. Nii on võimalik saada madala pinnalaenguga väikesed kompleksid ning ioniseeritavate polümeeride tõttu on võimalik suurendada endosoomist põgenemist (joonis 3) (Cullis ja Hope, 2017).

Liposoomide puuduseks võiks lugeda valmistamisprotseduuri keerukust, mille tõttu igal üksikul teadusrühmal ei pruugi olla võimalik saavutada samasuguseid partikleid. Lisaks koosnevad liposoomid tavaliselt vähemalt neljast komponendist (lisaks veel kargo), mis võib põhjustada veel ühe valmistamise komplikatsiooni ja replitseeritavuse potentsiaalse probleemi. (Schlenk *et al.*, 2013)



Joonis 3. Liposoomi struktuur. Katioonsed ja struktuuri lipiidid kondenseerivad nukleiinhappe mitselli ning hüdrofoobseks ankruks on kolesterool. Cullis ja Hope 2017

Katioonsed polümeer-kandjad on mitmekesise struktuuriga ja paindliku funktsionaalsusega. Polümeerid sisaldavad tavaliselt palju amiinrühmi, mis on protoneeritavad füsioloogilise pH lähedal. Polümeeride segamisel nukleiinhapetega moodustub elektrostaatiliste koosmõjude tõttu kompleks ehk polüpleks. Polüplekside transfektsiooni efektiivsus ja ohutus sõltub kasutatava polümeeri struktuurist. Üks tuntumaid vektorina kasutatud polümeere on polüetüleenimiin (PEI), mille kasutamist kirjeldati esmakordselt 1995 (joonis 4) (Boussif *et al.*, 1995). Hargnenud PEI-l on primaarsed, sekundaarsed ja tertsiaarsed amiinid, millest 15-20% on protoneeritud füsioloogilise pH juures (Akinc *et al.*, 2005). Amiinid, mida ei protoneerita, on erinevate pKa väärtustega ning oletatakse, et need annavad puhverdamise võime, mille abil PEI on võimeline vahendama endosoomist vabanemist (Yang *et al.*, 2014). PEI võime transportida geneetilist materjali ja tsütotoksilisus on seotud molekulmassiga. Kõrge molekulmassiga (25 kDa) PEI on kõrge transfektsiooni võimega, kuid kõrvalmõjudega, samas madala molekulmassiga langeb nii tsütotoksilisus kui transfektsioon. Seda nimetatakse laengu dilemmaks (Grund *et al.*, 2011). Lisaks on näidatud, et lineaarne PEI põhjustab vähem kõrvaltoimeid ja transfekteeb efektiivsemalt kui hargnenud PEI (Schlenk *et al.*, 2013). *In vivo* kasutamiseks on loodud kommertsiaalne JetPEI, mis peamiselt transfekteeb kopsu, põrna, maksa ja neeru (<http://www.polyplus-transfection.com/products/in-vivo-jetpei>)



Joonis 4. Lineaarse ja hargnenud PEI struktuur (Yin *et al.*, 2014)

1.3 Rakku sisenevad peptiidid

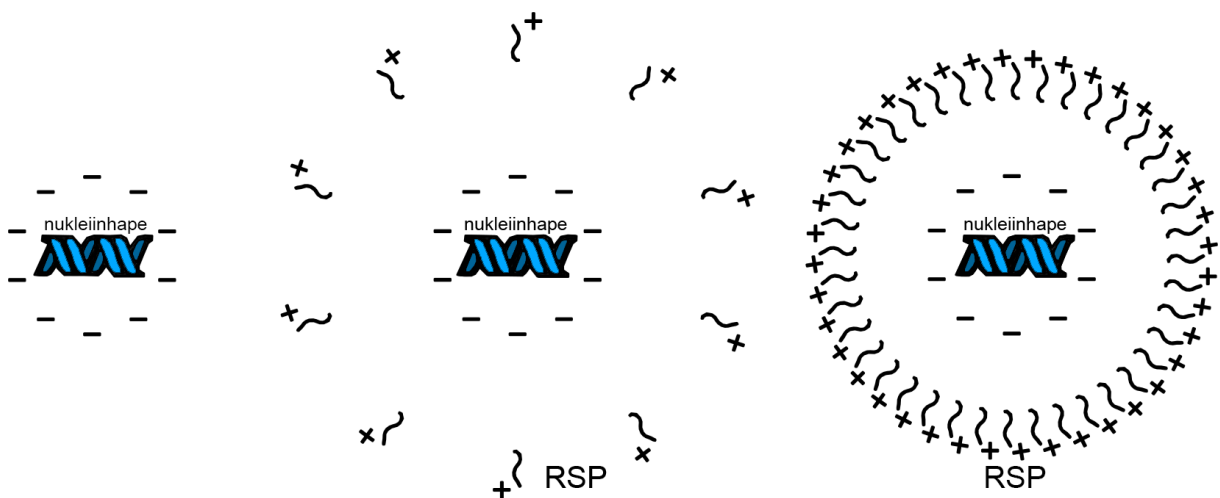
Mitte-viraalsete transportvektorite hulka kuuluvad ka rakku sisenevad peptiidid (RSP) ehk valgu transduktsiooni domeenid. RSPd on enamasti 5-30 aminohappe pikkused ning võimelised rakumembraani läbima. (Milletti, 2012). 1988 avastati, et HIVst pärit

transkriptsiooni transaktivaator (TAT), on võimeline läbima rakumembraani (Frankel ja Pabo, 1988). Esimene RSP oli TAT valgust pärit 86 AH pikkune järjestus, mis säilitas rakku sisenemise võime ka osade aminohapete eemaldamisel järjestusest (Green ja Loewenstein, 1988). Järgmine rakumembraani läbiv valk, mis avastati, oli *Drosophila Antennapedia* homeodomään (Joliot *et al.*, 1991). Hiljem leiti, et homeodomääni kolmandale heeliksile vastav 16 aminohappe pikkune järjestus suutis siseneda rakkudesse ning selle peptiidi nimeks sai Penetratin (Derossi *et al.*, 1994). Aastal 1997 selgus, et TAT peptiidi sisenemiseks on vajalik vaid 12 aminohappe pikkune osa (Vivès *et al.*, 1997).

1.3.1 Seondumine lastmolekuliga

RSPd peavad seonduma oma lastmolekuliga, et neid rakku viia. Lastmolekulideks võivad olla erinevad nukleiinhapped, nagu pDNA, oligonukleotiidid ja siRNA. Nukleiinhappeid on võimalik siduda kovalentselt või mitte-kovalentselt. Esimese puhul tekib stabiilne ja keemiliselt hästi defineeritud molekul. Samuti võib nukleiinhape kaotada oma bioloogilise aktiivsuse. Kovalentne sidumine on kulukas ja töömahukas meetod ning seetõttu eelistatakse võimaluse korral mitte-kovalentset sidumist (Margus *et al.*, 2012).

Mitte-kovalentne sidumine põhineb hüdrofoobsetel ja elektrostaatilistel jõududel anioonse transporditava makromolekuli ja positiivselt laetud RSP vahel, mille tulemusena tekib nanopartikkel (joonis 5). Nanopartikli valmistamiseks segatakse kokku nukleiinhape ja RSP vesikeskkonnas ning toatemperatuuril inkubeerides moodustuvad nanopartiklid spontaanselt. Tekkinud kompleks kaitseb nukleiinhapet nukleaaside eest, soodustab püsimist vereringes ning vähendab väljutamist neerude kaudu (Kurrikoff *et al.*, 2016).



Joonis 5. Mitte-kovalentne peptiidi ja lastmolekuli seondumine. (Autori joonis)

1.3.2 RSPde klassifikatsioon

RSPsid saab jagada rühmadesse päritolu, füüsikaliste omaduste, funktsiooni või rakku sisenemise mehhanismi järgi. Enim kasutatakse füüsikaliste omaduste põhist liigitamist, mis jaotab peptiidid kolme suurde rühma: katioonsed, amfipaatsed ja hüdrofoobsed peptiidid (Milletti, 2012).

Katioonsed peptiidid võivad olla mitte-amfipaatsed ning need kannavad positiivset laengut füsioloogilise pH juures ja enamasti kuuluvad järjestusse vaid arginiinid ja lüsiinid. Siia gruppi kuuluvad näiteks TAT, Penetratin ja polüarginiin (Guidotti *et al.*, 2017). Katioonsete RSPde alla liigituvad ka tuuma lokaliseerumise signaali (NLS) omavad peptiidid. NLS on lühike peptiidne järjestus, mis põhineb lüsiini, arginiini või proliini sisaldavatel motiividel, mis suudavad siseneda rakutuuma läbi tuumapooride kompleksi (Milletti, 2012).

Amfipaatsed RSPd sisaldavad nii polaarseid kui hüdrofoobseid osa. Lisaks lüsiinile ja arginiinile esineb järjestuses ka hüdrofoobseid aminohappeid, näiteks valiini, leutsiini, isoleutsiini võialaniini (Guidotti *et al.*, 2017). Amfipaatsed peptiidid jagunevad omakorda primaarseteks ja sekundaarseteks RSPdeks. Primaarsete amfipaatsete RSPde primaarjärjestuses on hüdrofoobne ja katioone osa (Ziegler, 2008). Primaarsete amfipaatsete RSPde hulka kuuluvad näiteks MPG ja Pep-1, mis mõlemad koosnevad kolmest domäänist ning kasutatakse nukleiinhapete transpordiks (Morris *et al.*, 2008). Sekundaarsetel amfipaatsetel RSPdel tekivad eraldiseisvad polaarsed ja hüdrofoobsed osad pärast peptiidi voltumist lahuses või bioloogilises keskkonnas (Guidotti *et al.*, 2017). Sekundaarsete amfipaatsete RSPde hulka kuulub näiteks MAP, mis on α -heeliksi konformatsiooniga (Oehlke *et al.*, 1998).

Hüdrofoobsed RSPd koosnevad peamiselt mittepolaarsetest aminohapetest ning neil on madal laeng. Rakku sisenemiseks on vajalikud hüdrofoobsed motiivid, millel on kõrge afiinsus rakumembraani hüdrofoobsetele domäänidele (Guidotti *et al.*, 2017). Hüdrofoobsete peptiidide hulka kuulub Pep-7 (Gao *et al.*, 2002). Hüdrofoobseid peptiide on võrreldes amfipaatsete ja katioonsete RSPdega vähem uuritud, kuid on püstitatud hüpotees, et need peptiidid suudavad rakku siseneda energiast sõltumatu moel, mis eristab neid teistest RSPdest (Marks *et al.*, 2011).

Tabel 1. RSPde näited ja klassifikatsioon

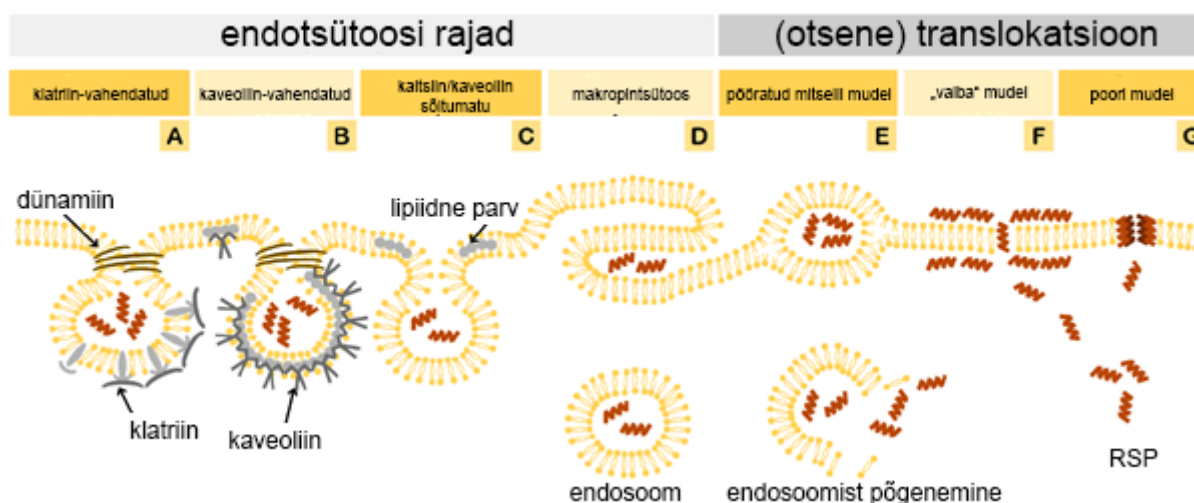
Peptiid	Järjestus	Klassifikatsioon	Viide
TAT	GRKKRRQRRPQ	Katioonne	Vivès <i>et al.</i> , 1997

Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	Katioonne	Derossi <i>et al.</i> , 1994
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	Amfipaadne (I)	Morris <i>et al.</i> , 1997
MAP	KLALKLALKALKALKLA	Amfipaadne (II)	Oehlke <i>et al.</i> , 1998
Pep-7	SDLWEMMMVSLACQY	Hüdrofoobne	Gao <i>et al.</i> , 2002

1.3.3 Sisenemise mehhanismid

RSPde rakkude sisenemist on palju uuritud, kuid ühte kindlat vastust veel ei ole. Selle põhjuseks on RSPde erinevad füsikokeemilised omadused, suurus, varieeruvad eksperimentaalsed tingimused ja RSPga seotud kargo mõju (Mueller *et al.*, 2008). RSP võib rakku siseneda kasutades erinevaid radu: energiast sõltumatult translokeeruda läbi plasmamembraani või läbi endotsütoosi raja, mis on energiast sõltuv (Guidotti *et al.*, 2017).

Osade RSPde puhul on näidatud, et nad suudavad rakku translokeeruda madalal temperatuuril, mis viitab, et need RSPd ei kasuta energiast sõltuvat rada. Kui RSPs kasutati D või L aminohapete enantiomeere, jäi rakkude translokeerumise efektiivsus samaks, mis viitab retseptorite mitte kasutamisele (Wender *et al.*, 2000). Nende järelduste põhjal on tehtud mitu sisenemise mudelit, näiteks pööratud mitsell, poori ja „vaiba-laadne“ mudel (joonis 6) (Ye *et al.*, 2016).



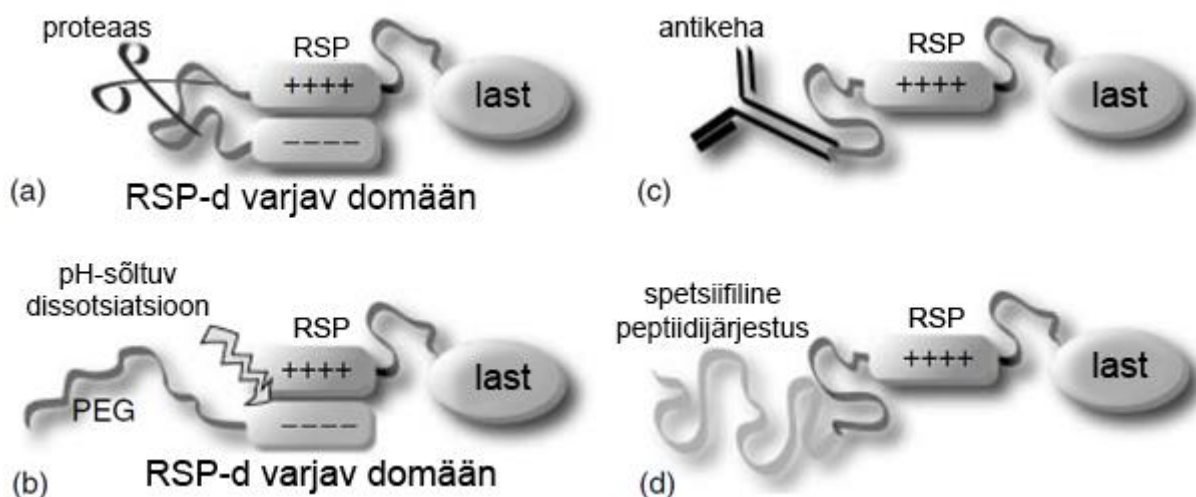
Joonis 6. RSPde sisenemine rakkudesse endotsütoosi või translokeerumise teel. (Mickan *et al.*, 2014)

Erinevad RSPd ja RSP/nukleiinhappe kompleksid kasutavad erinevaid endotsütoosi radu ning võivad kasutada mitut erinevat rada paralleelselt. Endotsütoosi saab jagada neljaks rajaks: klatriin-vahendatud endotsütoos, makropinotsütoos, kaveoliin-vahendatud endotsütoos ning

klatriinist ja kaveoliinist sõltumatu endotsütoos (joonis 6). Kasutatav rada sõltub peptiidi järjestusest, kontsentratsioonist, kargo omadustest ja raku plasmamembraani omadustest (Koren ja Torchilin, 2012). Endotsütoosi kaudu sisenedes peab RSP vabanema endosoomist tsütosooli, vastasel juhul toimub RSP ja kargo lagundamine lüsoosoomis madala pH juures. Endosoomist pääsemise võimalusteks on püstitatud mitu hüpoteesi. RSP positiivsed laengud võivad seonduda endosoomi membraani negatiivsete laengutega, mis põhjustab membraani jäigenemise ning purunemise, mille järel vesiikuli sisu vabaneb (Hitz *et al.*, 2006). Peptiidi järjestusse pH-tundlike motiivide sünteesimine võib samuti aidata endosoomist põgeneda. Näiteks histidiini sisaldavad peptiidid protoneeruvad pH langemisel ning suureneb prootonite ja Cl⁻ ionide sissevool, mis põhjustab veemolekulide sisenemise kuni osmootilise rõhu suurenemiseni ja endosoom puruneb. Sellist mehhanismi kutsutakse prooton-käsna efektiks (Lo ja Wang, 2008).

1.3.4 Selektiivne transport

Enamus RSPsid suudavad siseneda erinevatesse rakkudesse. *In vivo* tingimustes võib mittespetsiifilisus põhjustada soovimatuid kõrvalefekte (Koren ja Torchilin, 2012). Spetsiifilise sihtmärgi ära tundmiseks on võetud kasutusele kaks erinevat lähenemist: aktiivsed ja passiivsed vektorid (joonis 7). Passiivsed vektorid põhinevad erinevate keskkonnatingimuste ära kasutamisel. Linkeri abil seotakse RSP varjava konjugaadiga, mis ei lase RSP siseneda rakkudesse, enne kui konjugaat on eemaldatud (Jiang *et al.*, 2004). Linkeri eemaldus võib olla keskkonna spetsiifiline, näiteks madal pH, kõrge temperatuur või kindla ensüümi, näiteks matriksmetalloproteinaasi olemasolu, kui ka välise ajendi tõttu, näiteks kuumus, ultraheli ja magnetväli (Ye *et al.*, 2016). Aktiivsed vektorid sisaldavad elementi, mis seondub märklaud rakuga kasutades ligandi, monoklonaalset antikeha või spetsiifilist peptiidijärjestust (*homing peptiide*) (Kurrikoff *et al.*, 2011).



Joonis 7. Passiivsed ja aktiivsed selektiivsed RSPd. a ja b - passiivsed vektorid, c ja d - aktiivsed RSP vektorid (Kurrikoff et al., 2011).

1.3.5 Transportaan ja derivaadid

Transportaan (TP) on 27 aminohappe pikkune sünteetiline peptiid, mis koosneb kahest osast. 12 aminohapet pärinevad galaniini N-terminaalsest osast ning 14 aminohapet pärinevad herilase mürgist mastoparaan. Need kaks osa on ühendatud lüsiiniga (Pooga *et al.*, 1998).

TP10 on TP analoog, kus eemaldati kuus aminohapet N-terminusest, sellel puudub GTPaaside aktiivsust mõjutav efekt ning seda ei tunne ära galaniini retseptorid, mistõttu võeti see kasutusele RSPna (Soomets *et al.*, 2000).

1.3.5.1 PepFect14

Lisades TP10-le stearoüülrühm N-terminusse, suurenes rakkude transfektsioon ja pakuti välja, et hüdrofoobne saba annab peptiidile lipofiilse omaduse, mis lihtsustab peptiidil rakku sisenemist, samuti stearoüülrühm soodustab endosoomidest vabanemist (Mäe *et al.*, 2008). Stearoüülrühmaga TP10 pani aluse PepFectide perekonnale ning stearoüül-TP10 uueks nimetuseks sai PepFect3 (PF3) (Langel *et al.*, 2010).

PepFect14 (PF14) on PF3 edasiarendus, kus lüsiinid on asendatud ornitiinidega. Kuna ornitiinid on mittestandardised aminohapped, siis pakuti välja, et seerumi proteaasid lagundavad uut peptiidi vähem (Ezzat *et al.*, 2011). Eelnevalt on näidatud, et ornitiine kasutades saavutatakse kõrgem transfektsioon võrreldes lüsiinide kasutamisega, mis tuleneb stabiilsematest kompleksidest, sest ornitiinid on pDNA suhtes afiinsemad kui lüsiinid (Ramsay ja Gumbleton, 2001). Samuti asendati PepFect3 järjestuses isoleutsiin leutsiiniga (Ezzat *et al.*, 2011).

PF14 suudab transportida nii SKOsid, pDNA-d kui siRNA molekule ning moodustavad nanopartikleid (Margus *et al.*, 2016). Moodustunud kompleksid on stabiilsed ka seerumi juuresolekul, mis on oluline *in vivo* tingimustel kasutamiseks. Kompleksid kasutavad rakku sisenemiseks endotsütoosi, tõenäoliselt kaveoliini vahendatud rada (Ezzat *et al.*, 2011, Veiman *et al.*, 2013). Eelnevalt on kirjeldatud, et PF14 kompleksid nukleiinhapetega kasutavad rakku sisenemiseks rakupinnal asuvaid püüdurreseptoreid, spetsiifilisemalt on PF14 kompleksid seotud kahe SCARA alatüübiga, SCARA3 ja SCARA5 (Ezzat *et al.*, 2012, Juks *et al.*, 2015).

Tabel 2. Töös mainitud peptiidid ja järjestused

Peptiidi nimi	Järjestus	Aminohappeline pikkus	Viited
Galaniin	GWTLNSAGYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS	30	Bartfai <i>et al.</i> , 1993
Mastoparaan	INLKALAALAKKIL	14	Higashijima <i>et al.</i> , 1988
Transportaan	GWTLNSAGYLLGKGINLKALAALAKKIL-NH ₂	27	Pooga <i>et al.</i> , 1998
Transportaan10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	21	Soomets <i>et al.</i> , 2000
PepFect3	Stearoüül-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	21	Langel <i>et al.</i> , 2010
PepFect14	Stearoüül-AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL-NH ₂	21	Ezzat <i>et al.</i> , 2011

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Töö eesmärgid

1. PF14 ja plasmiidse DNA suhte optimeerimine bioaktiivsuse parandamiseks ja kõrvaltoimete vähendamiseks

- a. Saavutada nanopartikli väiksem opsonisatsioon
- b. Mõõta optimaalsete nanopartiklite bioaktiivsus

2. PF14 üldlaengu ning hüdrofoobsuse optimeerimine efektiivsemaks pDNA transpordiks

- a. Kirjeldada mõlema parameetri mõju moodustunud komplekside füsikokeemilistele omadustele
- b. Testida komplekside stabiilsust *in vivo* barjääre modelleerivates keskkondades
- c. Uurida vastavate nanopartiklite bioaktiivsust

2.2 Materjalid ja metoodika

Kõik meetodite osas kirjeldatud tegevused (peale peptiidsünteesi, DLS mõõtmise ja loomkatsete) viis läbi ja tulemuste analüüsi teostas töö autor.

2.2.1 Peptiidi süntees

Eksperimentides kasutatud peptiid sünteesiti molekulaarse biotehnoloogia labori poolt. Peptiidid sünteesiti etapiviisilisest 0,1 mmol skaalal automaatse peptiidi süntesaatoriga (Initiator Alstra, Biotage), kasutades Fmoc tahke faasi peptiidi sünteesi meetodit ning eelnevalt optimeeritud protokoll. Tahke faasina kasutati Rink-amiidi MBHA ChemMatrix vaiku (Biotage), et saada C-terminaalselt amideeritud peptiide. Rasvhappe lisati N-terminusse, kasutades 5 kordses ülehulgas rasvhapet (Sigma- Aldrich). Aktivaatorina kasutati DIEA (Sigma- Aldrich) ja sidumisreagentidena HOBt/HBTU (Multisynthtech) lahustatud DMFs.

Peptiidi eemaldamiseks tahkelt kandjalt kasutati 95% trifluoroatseethapet/2,5% TIS/2,5% vett ja inkubeeriti toatemperatuuril 2 tundi. Peptiidide puhastamiseks kõrvalproduktidest kasutati RP-HPLC C3 kolonni ja 5-80% atseetonitriil/MQ gradienti. Peptiidide molekulmassi hinnati MADLI-TOF massspektromeetriga.

2.2.2 Komplekside moodustamine

Rakukultuuri transfektsiooni jaoks moodustati kompleksid kasutades 0,5 µg pDNA-d, mis segati erinevatel laengusuhtel (N/P) peptiidi ja MQ veega nii, et lõppruumala oleks 50 µl. N/P suhted saadi arvutuslikult, võttes arvesse peptiidi positiivset ja pDNA negatiivset laengut. Komplekse inkubeeriti toatemperatuuril 40 minutit enne rakkudele lisamist.

In vivo katsete jaoks segati 20-50 µg pLuc2 plasmidi looma kohta erinevatel N/P suhtel MQ vees ning komplekside lõppruumala oli 100 µl. Näiteks 20 µg pDNA doosi korral N/P4 juures oli peptiidi lõppkontsentratsioon 512 µM. Pärast 40 minutist inkubatsiooni lisati kompleksidele glükoosi lõppkontsentratsioonini 5% ning lõppmahuni 200 µl ja lahustati hiirte sabaveeni intravenoosselt. Jet-PEI komplekse kasutati positiivseks kontrolliks ning need valmistati tootja protokoll järgi N/P8 juures: 20µg pLuc2 plasmidi segati MQ veega ning Jet-PEI MQ veega. Mõlemale lahusele lisati glükoosi lõppkontsentratsioonini 5%. Seejärel lisati Jet-PEI lahust pDNA lahusele ning kompleksid inkubeerisid toatemperatuuril 30 minutit. *In vitro* tingimustes kasutatud Jet-PEI kompleksid valmistati samamoodi, kuid valminud kompleksid lahjendati kasutades 5% glükoosi vajaliku pDNA doosini.

2.2.3 Opsonisatsiooni hindamine

Kompleksidele lisati võrdses mahus komplekside ruumalaga veise looteserumit (FBS) ning inkubeeriti proove 40 minutit toatemperatuuril. Komplekse tsentrifuugiti 90 minutit 18625 G juures ning sadet pesti 5 korda MQ veega. Proovid kanti SDS polüakrüülamiid geelile (NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gel, Invitrogen), kus proove elektroforeeriti tund aega tingimustel 115mA ja 200V. Geeli värviti tund aega Coomassie värviga (ThermoFisher Scientific SimplyBlue™ SafeStain) ning pildistati. Piltidelt kvantiteeriti värvunud alad ImageJ programmiga.

2.2.4 Vastupidavus ensümaatilisele lagundamisele

Eelnevalt valmistatud kompleksid N/P4 juures (0.3, 0.2, 0.1 ja 0.05 µg pDNAd proovi kohta) pandi musta värvi 96-kaevulisse plaati ning lisati 90µl MQ vett. Seejärel lisati DNAGA interkaleeruvat fluorestsents värvi tootja protokoll järgi (Quant-iT™ PicoGreen®, ThermoFisher Scientific) ja inkubeeriti proove 5 minutit toatemperatuuril. Fluorestsentsi mõõtmiseks kasutati fluorimeetrit (Synergy MX, BioTek; λ_{ex} 492 and λ_{em} 535), et määrata seotud pDNA hulka kompleksis. Seejärel lisati igale proovile >20 U/ml Proteinaas K (Thermo Scientific). Fluorestsentsi mõõdeti 220 minuti jooksul 26°C juures, et jälgida Proteinaas K mõju pDNA vabanemisele kompleksist. Saadad fluorestsentsi väärtused normaliseeriti kompleksi 0 ajapunkti vastu enne proteinaas K lisamist.

2.2.5 Komplekside pinnalaengu ja hüdrodünaamilise diameetri mõõtmine

Moodustunud komplekside hüdrodünaamilise diameetri mõõtmiseks kasutati dünaamilist valguse hajumise meetodit (DLS, *dynamic light scattering*) Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) aparaadi abil. Peptiidi/pDNA kompleksid valmistati kasutades 1 µg pDNAd, mis segati erinevatel laengusuhetel (N/P) peptiidi ja MQ veega nii, et lõppruumala oleks 100 µl. Komplekside suurust mõõdeti toatemperatuuril. Iga proovi valmistati kolmes korduses ja iga proovi mõõtmisel teostati 10 tehnilist kordust, (üks mõõtmine kestis 10 sekundit). Zeta potentsiaali mõõtmiseks valmistati kompleksid, kus lõppruumala oli 300 µl ja pDNA kontsentratsioon oli 0.01 µg/µl. Kompleksid lahjendati MQ vees lõppruumalani 1 ml. Mõõtmised tehti toatemperatuuril ning iga proovi mõõdeti kolmes korduses 10 korda.

2.2.6 Rakukultuur ja transfektsioon

CHO (hiina hamstri munasarja) rakkude jaoks kasutati Ham's F12 söödet ning rakke kasvatati niiskes keskkonnas 37°C juures 5% CO₂ sisaldusega. Söötmesse oli lisatud 0.1 mM

asendatavaid aminohappeid, 0.1mM naatriumpüruvaati, 10% FBSi, 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini (PAA Laboratories GmbH, Saksamaa).

Transfektsiooniefektiivsuse hindamiseks kasutati lutsiferaasi reprotersüsteemi. Selleks kasutati pLuc2 plasmidi, kus CMV promootori all oleva Luc2 geeni transkriptsiooni järel toodetakse lutsiferaasi valku, mis peale tema substraadi, lutsiferiini, lisamist eraldab bioluminestsentsi, mida on võimalik mõõta luminomeetriga.

Plasmidi transfektsiooniks külvati $2,5 \times 10^4$ CHO rakku 48-kaevulisele plaadile 24 tundi enne katset. Rakkudele lisati kompleksid ning 4 tundi pärast transfektsiooni lisati rakkudele 1 ml söödet. 20 tundi hiljem rakud lüüsi 15 minuti jooksul 4°C juures kasutades 100 µl 0.1% Triton-X lahust PBSis. Lutsiferaasi aktiivsust mõõdeti Promega lutsiferaasi testsüsteemiga tootja protokoll järgi. Selleks lisatakse 20 µl rakulüsaadile 80 µl lutsiferiini, misjärel kvantiteeritakse bioluminestsents. Mõõtmised tehti GLOMAX™ 96 mikroplaadi luminomeetriga (Promega, Rootsi) ning saadud RLUD (suhtelise valguse ühik, *relative light unit*) väärtused normaliseeriti valgu sisalduse vastu (BioRad Protein Assay, USA).

2.2.7 Rakkude elumuse hindamine

Rakkude elumuse hindamiseks kasutati MTS proliferatsiooni analüüsi (CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Rootsi). Rakusöötmesse lisatakse MTS tetrasoolium ühendit, mis metaboolselt aktiivsetes rakkudes muudetakse NADPH või NADH abil formasaniks, mille neelduvust on võimalik mõõta kolorimeetriliselt.

Selleks, et mõõta rakkude elumust külvati 96-kaevulisele plaadile CHO rakud (10^4 rakku kaevu kohta). 24 tunni möödudes transfekteriti rakud kasutades 1:10-le lahjendatud RSP/pLuc2, JetPEI/pLuc2 komplekse ning komplekseerimata pLuc2. Elumuse mõõdetud numbrilised väärtused normaliseeriti töötlemata rakkude elumuse väärtustega.

2.2.8 Lutsiferaasi taseme kvantifitseerimine kudedest

Kõik hiirtega läbiviidud protseduurid ning eksperimendid on kinnitatud Eesti Eetikakomitee loaga (luba nr. 69 ja 70, 9 veebruar 2011 ja luba nr 81 04.04.2016) ning läbi viidud katseloomadega tööloa omavate töötajate poolt.

24 tundi pärast komplekside manustamist hiired ohverdati tservikaaldislokatsiooniga ning kogutud koed kiirkülmutati kuival jääl. Koed homogeniseeriti kasutades Precellys®24-Dual homogenisatsiooni süsteemi (Bertin Technologies, Prantsusmaa) ja lüüsi kasutades 1xPromega lüüsihuvrit (Promega, Rootsi). Homogeniseeritud koed sulatati ja neile lisati 500

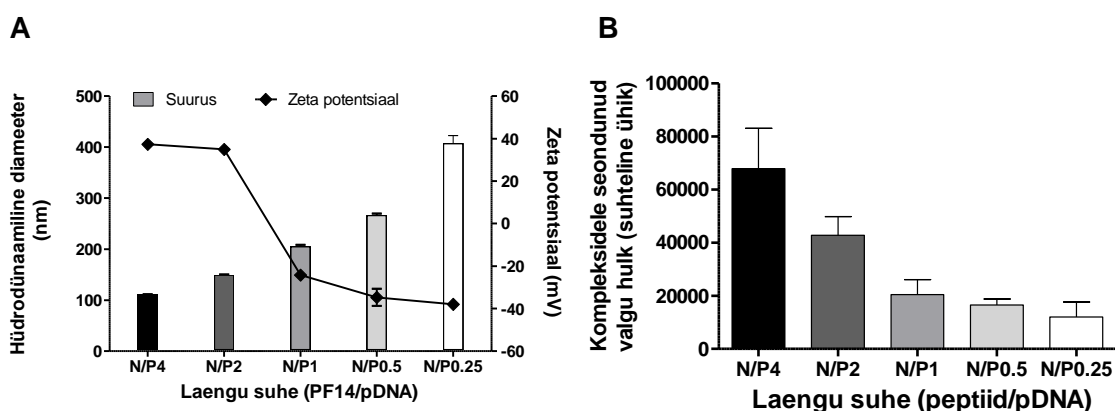
µl Promega Reporter 1 x lüüsi puhvrit. Proove segati vortexil 15 minutit, millele järgnes kolm järjestikust külmutamis-sulatamis tsüklit kasutades vedelat lämmastikku ja 37 °C vesivanni. Seejärel proove tsentrifuugiti kolm minutit 10 000g ja 4 °C juures. Proovidelt eemaldati supernatant ning säilitati hilisemaks analüüsiks. Sademele lisati uuesti 500 µl lüüsi puhvrit ning protsessi korrati, kuid külmutamis-sulatamis protsess jäeti vahele. Teisel korral saadud supernatant segati esimese supernatandiga. Lutsiferaasi aktiivsust mõõdeti Promega lutsiferaasi testsüsteemiga kasutades GLOMAX 96 mikroplaadi lugejat (Promega, Rootsi). Selleks kanti 20 µl supernatanti valgele 96-kaevulisele plaadile ning lisati 80 µl lutsiferaasi substraati igale proovile. Iga proovi mõõdeti kolmes tehnilises replikaadis ning nende keskmist RLU väärtust kasutati andmeanalüüsis. Iga RLU normaliseeriti proovi valgu sisalduse vastu (RioRad, USA) ja saadud RLU/mg kohta normaliseeriti vastava koe baasväärtusega, mis on saadud komplekseerimata pDNA süstimisega.

2.3 Tulemused

2.3.1 Nanopartiklite füsikokeemiliste omaduste iseloomustamine

Antud töö esimeses osas uuriti, kuidas valmistada nanopartikleid, et vähendada kõrvalmõjusid, mis kaasnevad PF14/pDNA nanopartiklite kasutamisel *in vivo* (Veiman *et al.*, 2015). Esmalt uuriti, millised on seni kasutatud nanopartiklite füsikokeemilised omadused. Selleks segati kokku erinevatel laengusuhtel PF14/pDNA komplekse, et uurida komplekside hüdrodünaamilist suurust ja zeta potentsiaali. Komplekside hüdrodünaamilise suuruse ja zeta potentsiaali mõõtmisel leiti, et suurematel N/P suhtel valminud kompleksidel oli väiksem diameeter, kuid suurem positiivne zeta potentsiaal. N/P4 juures valmistatud komplekside hüdrodünaamiline diameeter on 111nm ning zeta potentsiaal 38 mV. Partikli suurus kasvas madalal laengusuhtel ning zeta-potentsiaal muutus negatiivseks, kui N/P suhe oli alla 2 (joonis 8). N/P0,25 kompleksi läbimõõt on peaaegu 4 korda suurem, kui N/P4 korral ning zeta potentsiaali väärtus on -38 mV.

Edasi uuriti, kas väiksema N/P suhte juures valmistatud kompleksidele, millel oli väiksem pinnalaeng, seob vähem seerumivalke. Suurematel N/P suhetel valmistatud partiklid olid rohkem opsoniseeritud, kui madalamatel suhetel. N/P2 kompleksid on 37% vähem kaetud kui N/P4 kompleksid, kuigi zeta potentsiaal on N/P4 ja N/P2 kompleksidel on ligikaudu sama. N/P1 korral on 70% vähem opsoniseerimist. Madalamatel N/P suhetel väheneb opsonisatsioon, mis võib tuleneda zeta potentsiaali langemisest.

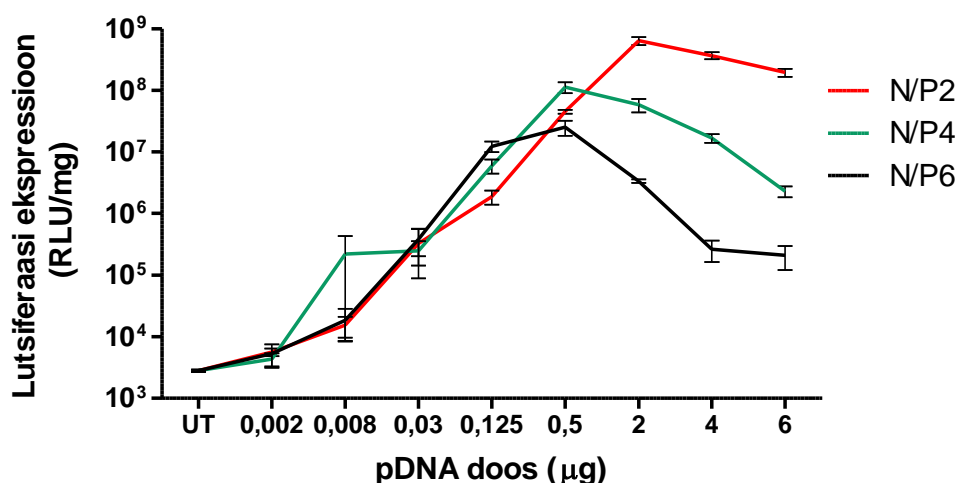


Joonis 8. Nanokomplekside iseloomustamine erinevatel N/P suhetel. A -DLS meetodil mõõdetud komplekside zeta potentsiaal ja hüdrodünaamiline diameeter, B – SDS-PAGE kvantiteeritud partiklitele seondunud seerumi valgud

2.3.2 pDNA koguse optimeerimine in vitro

Selleks, et vähendada komplekside kõrvalmõjusid, kuid säilitada bioaktiivsus optimeeriti PF14/pDNA komplekside valmistamist ning nanopartiklid moodustati kolmel erinevatel N/P

suhtel. Lisaks varieeriti pDNA kontsentratsiooni (joonis 9). Rakukultuuri transfektsiooni standard protokollil puhul kasutatakse 0,5µg pDNA-d, mille juures on kõige suuremat valgus-ekspressiooni põhjustanud N/P4. Madalamate pDNA dooside juures näeme vastavalt madalamat transfektsiooniefektiivsust. pDNA doosi suurendamisel suureneb transfektsiooni efektiivsus vaid N/P2 juures ning kõrgematel N/P suhetel, kui pDNA doos ületab 2 µg, geeniekspressioon väheneb CHO rakkudes, sest kompleksid mõjutavad rakkude elumust. Visuaalsel mikroskoopia vaatamisel on näha rakkude morfoloogilisi muutusi, mis viitab komplekside põhjustatud kõrvaltoimetele. Kõrgemate N/P suhete puhul avalduvad toksilised toimed juba 0,5 µg doosist alates. Seega nägime, et kasutatavatel (mittetoksilistel) pDNA doosidel sõltus transfektsiooniefektiivsus vaid doosi suuruselt (sõltumata N/P suhtest), kuid N/P valik mõjutas toksilisuse avaldumist—madalamate laengusuhete kasutamine võimaldab suuremate pDNA dooside kasutamist. Edasi huvitas meid, kas sama põhimõtte kehtib ka *in vivo* süsteemsel manustamisel.

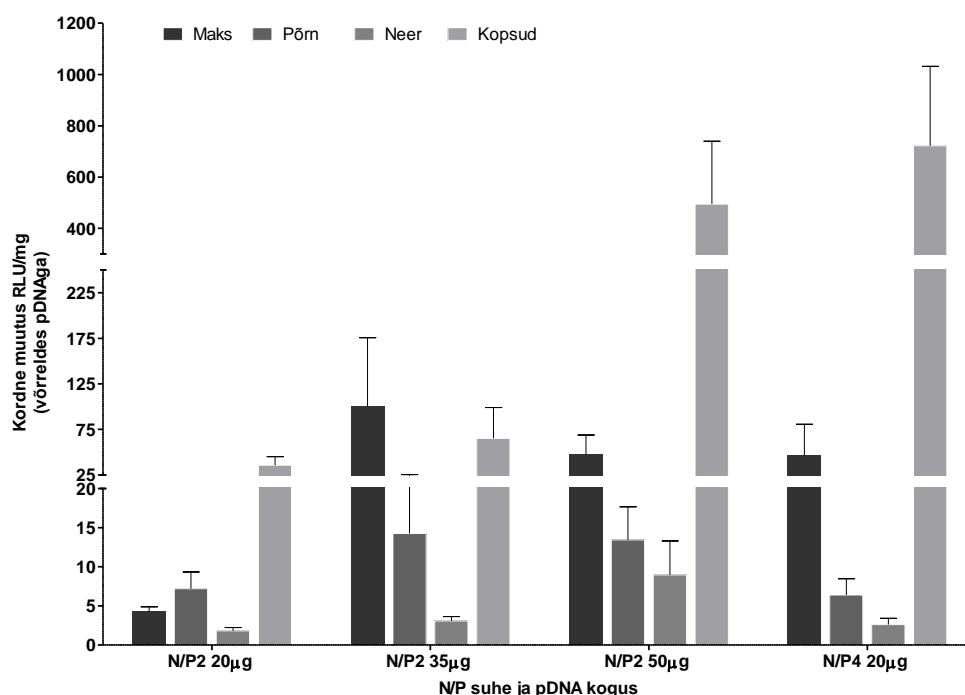


Joonis 9. PF14/pLuc2 transfektsiooniefektiivsus erinevatel N/P suhetel CHO rakkudes

2.3.3 Uue formulatsiooni mõju *in vivo*

Uuriti PF14/pLuc2 komplekside transfektsiooni kudedes ning bioaktiivsust. Inspireerituna joonisel 9 näidatud transfektsiooniefektiivsuste profiilist, valmistati kompleksid erinevate N/P juures, varieerides pDNA kontsentratsiooni. Kasutades standardkomplekse N/P4 suhet 20 µg pDNAga, saavutatakse kõige efektiivsem geeniekspressioon erinevates kudedes, kuid nende komplekside kasutamisel esinevad ka kõrvaltoimed, mille tõttu mõned hiired surevad manustamise järel akuutse kõrvaltoime tagajärjel (tabel 4) (Veiman *et al.*, 2015). Nagu varasemalt näidatud, nägime ka seekord, et N/P2 juures sama pDNA koguse korral langeb

bioaktiivsus (Veiman *et al.*, 2015). Manustades optimeeritud formulatsiooni, kus kasutatakse N/P2 suhet ja kõrgemat pDNA doosi tõuseb lutsiferaasi ekspressioon kudedes. Kasutades 50 µg pDNAd kompleksi moodustamiseks, saavutatakse sarnane efekt, kui kasutada N/P4 komplekse (joonis 10). Oluline on, et N/P2 juures valmistatud kompleksid ei põhjustanud kõrvaltoimeid ning ükski hiir ei surnud. Peamiselt transfecteerivad PF14 kompleksid kopse, maksa ning põrna (joonis 10).



Joonis 10. PF14/pLuc2 komplekside transfectsiooni efektiivsus in vivo kasutades erinevaid pDNA doose

2.3.4 RSP modifikatsioonide mõju nanokomplekside füsikokeemilistele omadustele

Töö teises osas püstitati hüpotees, et kompleksides RSP hulga vähendamine võiks vähendada komplekside poolt põhjustatud kõrvaltoimeid. Kuna RSP hulk kompleksis on määratud N/P suhtega, siis saab seda vähendada, kui kasutada suurema koondlaenguga peptiidi. Selleks sünteesiti PF14 analoogid (tabel 3), millel olid erinevad summaarsed laengud. Esimene analoog oli PF14-O, kus kaksalaniini vahetati ornitiinide vastu positsioonil 14. ja 15. Sellel peptiidil on laeng +7 ning peptiidi on vaja 2,7 korda vähem kompleksi moodustamiseks kui modifitseerimata PF14 puhul. Teine loodud analoog sai nimeks PF14-E ning sellel asendati ornitiin glutamiinhappega 10. positsioonil. Antud peptiidi summaarne laeng on +3.

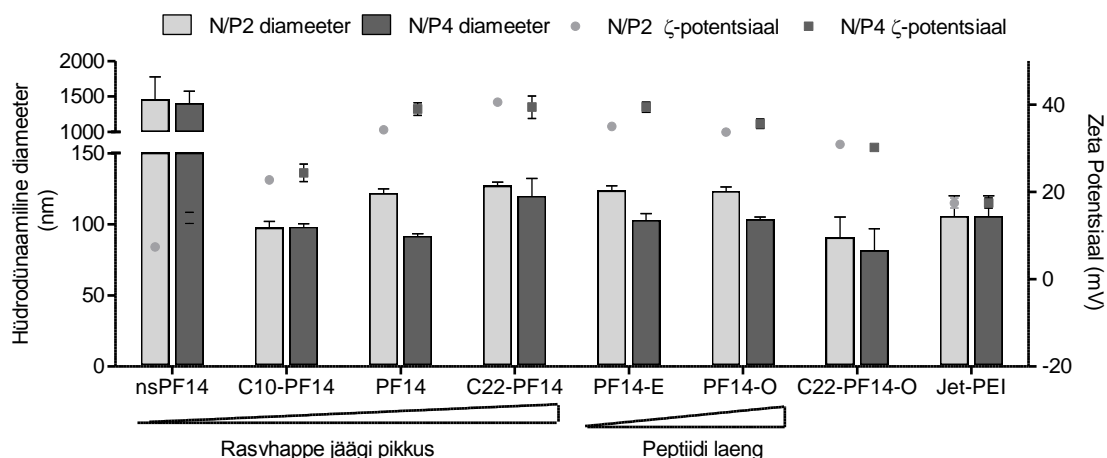
Lisaks laengute muutmisele sünteesiti PF14 analoogid, kus modifitseeriti rasvhappe jäägi pikkust, et uurida alküülahela pikkuse mõju moodustunud komplekside füsikokeemilistele omadustele (tabel 3). PF14 peptiidis kasutatud süsivesinik ahela pikkus on 18 süsinikku, loodud analoogides suurendati pikkus 22 süsinikuni (C22-PF14) või alandati 10 süsinikuni (C10-PF14). Kontrollina kasutati stearoüülrühmata peptiidi nsPF14. Laengu ja hüdrofoobsuse suurenemise koosmõju hindamiseks disainiti peptiid C22-PF14-O, millel oli nii suurenenud laeng ornitiidinide lisamise tõttu ning 22 süsinikuga rasvhappe jääk.

Tabel 3. PF14 analoogid

Nimi	Järjestus	Modifikatsioonid, laeng
PF14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{-CONH-AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL-NH}_2$	+5
PF14-O	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{-CONH-AGYLLGKLLOOLA}\text{OO}\text{ALOOLL-NH}_2$	A14 ja A15 asendatud O14 ja O15 vastu, +7
PF14-E	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{-CONH-AGYLLGKLEOLAAAALOOLL-NH}_2$	O10 asendatud E10 vastu, +3
nsPF14	$\text{H}_2\text{N-AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL-NH}_2$	N-terminus vaba, +6
C10-PF14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{-CONH-AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL-NH}_2$	Alküülahela pikkus 10 süsinikku, +5
C22-PF14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{-CONH-AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL-NH}_2$	Alküülahela pikkus 22 süsinikku, +5
C22-PF14-O	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{-CONH-AGYLLGKLLOOLA}\text{OO}\text{ALOOLL-NH}_2$	A14 ja A15 asendatud O14 ja O15 vastu, alküülahela pikkus 22 süsinikku, +7

Sünteesitud peptiididega ja pDNAGA moodustati kompleksid ning mõõdeti nende hüdrodünaamiline diameeter ja zeta potentsiaal. Lisaks RSPdele võeti võrdluseks JetPEI, millel on kõrge laengu tihedus ning pDNAGA valmistatud kompleksidega on eelnevalt näidatud efektiivset *in vivo* transfektsiooni (Veiman *et al.*, 2015). nsPF14 puhul moodustunud kompleksid olid umbes 1,5 mikromeetri suurused agregaadid. Teised analoogid moodustasid pDNAGA nanopartikleid, mille diameeter jäi 100 nm lähedale (joonis 11). Kõrgema N/P juures moodustusid väiksema läbimõõduga nanopartiklid. PF14 analoogidel, millel oli muutunud laeng, jäi partikli diameeter sarnaseks PF14ga, kuid muutes rasvhappe jäägi pikkust suurenes partikli hüdrodünaamiline diameeter rasvhappe pikenemisel. Ka zeta potentsiaal oli madalam lühema rasvhappe jäägi korral ning kasvas neutraalsest positiivseks rasvhappe pikenemisel.

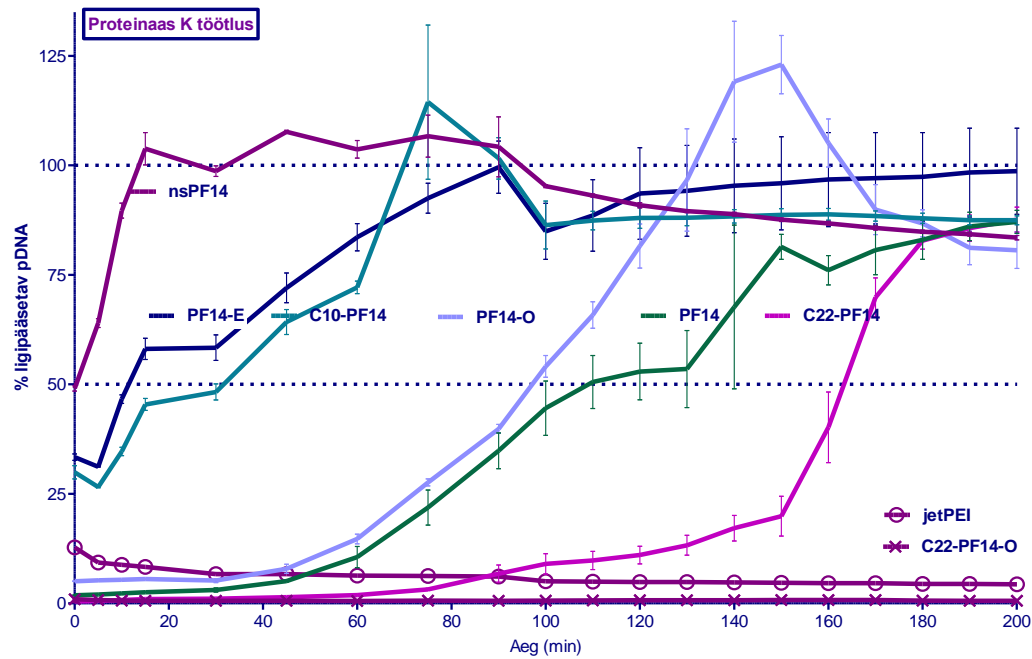
JetPEIga moodustunud komplekside zeta potentsiaal oli madalam, kui RSPdega valmistatud kompleksidel, jäädes 20mV juurde.



Joonis 11. DLS meetodil mõõdetud PF14 analoogide hüdrodünaamiline diameeter ja zeta potentsiaal

2.3.5 PF14 modifikatsioonide mõju komplekside stabiilsusele

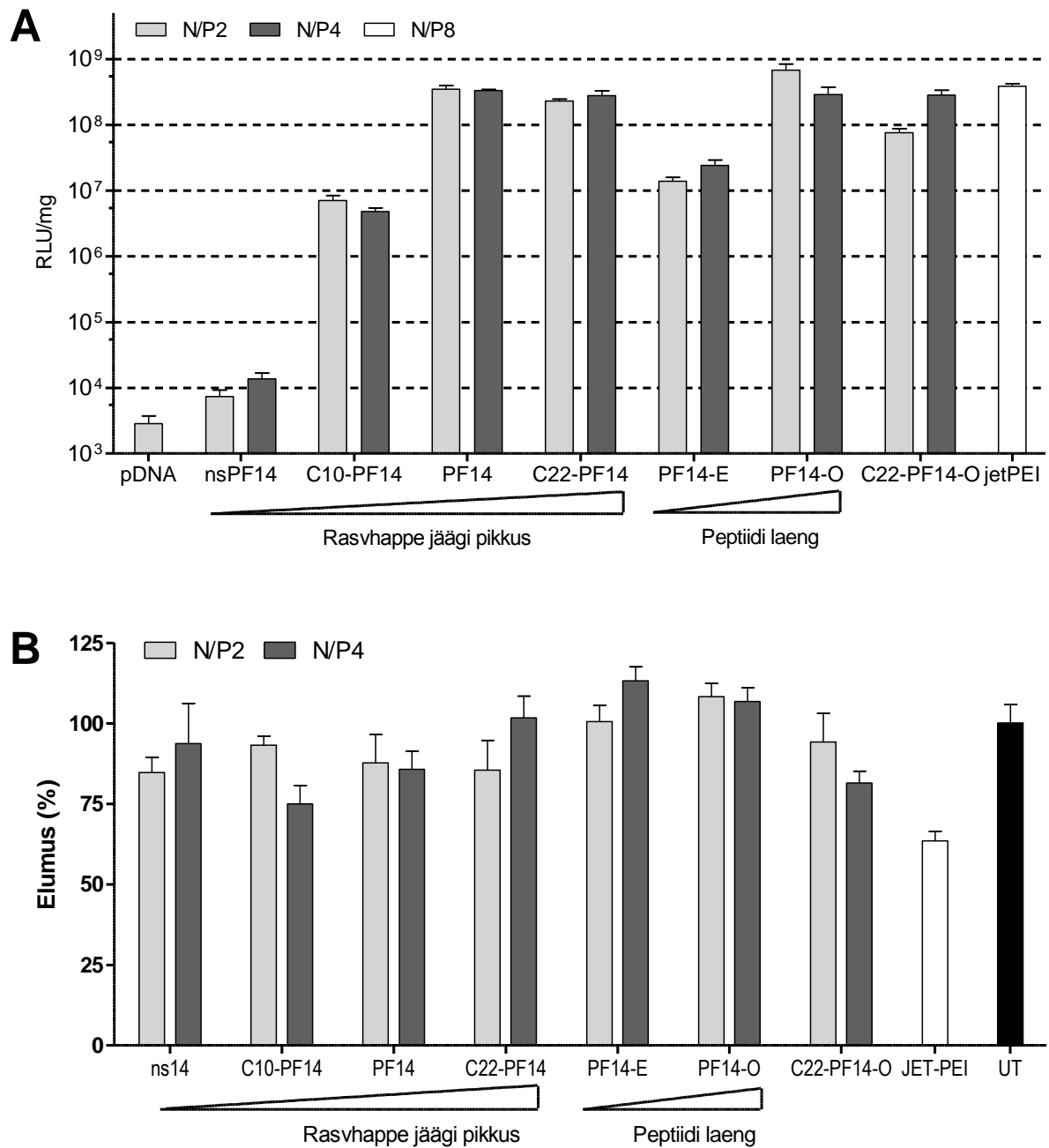
RSP/pDNA N/P4 komplekside stabiilsuse hindamiseks proteaasi lagundamise vastu töödeldi neid proteinaas K-ga, mis lõikab peptiidsidet suhteliselt mittespetsiifiliselt alifaatsete ja aromaatssete aminohapete järelt. PF14 kompleksidest on pDNA vabanemise poolväärtusaeg 108 minutit. Rasvhappe jäägi lühendamisel komplekside stabiilsus vähenes, kõige kergemini lagundatav kompleks oli moodustatud nsPF14-ga, mille kogu pDNA oli detekteeritav juba 20 minutiga (joonis 12). Laengu muutmine moodustunud RSP/pDNA komplekse stabiilsemaks ei muutnud ning pDNA vabanes kompleksidest kiiremini kui PF14/pDNA komplekside korral. Kompleksi vastupidavus suurenes rasvhappe jäägi pikenemisega. Suurendades ühekorraga nii PF14 laengut kui hüdrofoobsust muutus kompleks ensümaatilisele töötlusele aga oluliselt vastupidavaks ning pDNA vabanemist ei toimunud. Nagu oodatud, ei toimunud ka JetPEI kompleksi lagunemist.



Joonis 12. RSP/pDNA komplekside töötus proteinaas K-ga. Y-teljel on kujutatud vaba pDNA hulka protsentuaalselt komplekseerimiseks kasutatud kogu pDNA. X-teljel on kujutatud aega, mille jooksul kompleksi lagundamine toimub

2.3.6 RSP modifikatsioonide mõju transfektsioonile

Modifitseeritud peptiidide *in vitro* transfektsiooni efektiivsuse mõõtmiseks moodustati kompleksid kahe erineva N/P juures ning kontrolliks kasutati JetPEId, mis vastavalt protokollile tehti N/P8 juures (joonis 13A). Võrreldes PF14ga ei mõjutanud rasvhappe jäägi pikendamine transfektsiooni efektiivsust, kuid lühendamine vähendas lutsiferaasi ekspressiooni. PF14 laengu vähendamisel samuti vähenes transfektsioon, kuid laengu suurendamisel oli transfektsioon efektiivsem kui JetPEI vahendatud transfektsioon.



Joonis 13. A - Erineva laengu ja hüdrofoobsusega PF14 analoogide transfektsiooniefektiivsused CHO rakkudes kasutades lutsiferaasi reportersüsteemi. B - Erineva laengu ja hüdrofoobsusega PF14 analoogide elumuse hindamine MTS meetodil 24h pärast töötlemist

Lisaks transfektsioonile hinnati ka moodustunud komplekside mõju rakkude elumusele 24 tundi pärast transfektsiooni (joonis 13B). Hüdrofoobsust mõjutades jäi komplekside transfektsiooni mõju elumusele samale tasemele PF14/pDNA kompleksidega, kus elumus oli üle 80%. Kõige enam mõjutas elumust JetPEI kompleks, mille korral langes elumus ligi 40%.

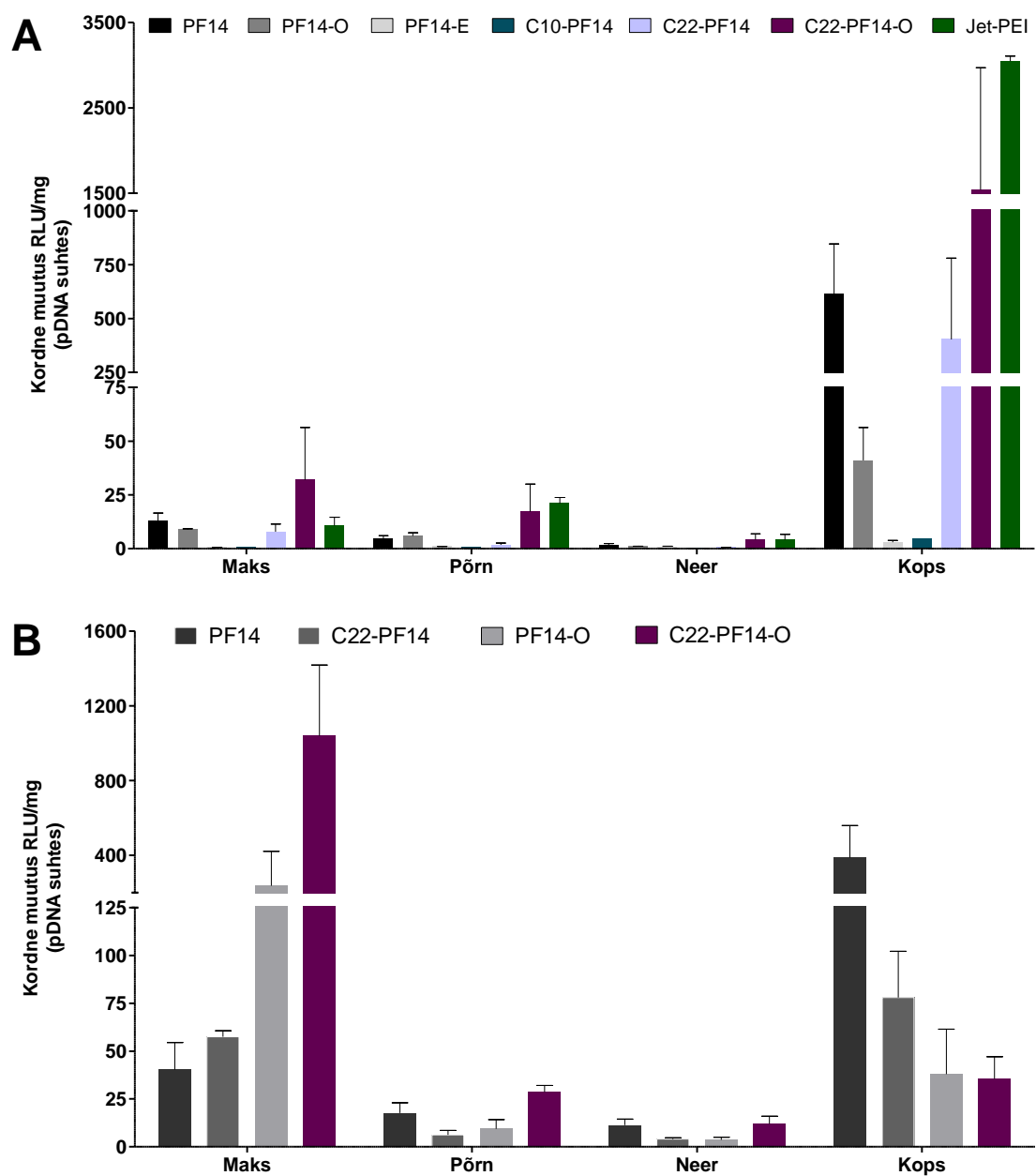
2.3.7 RSP/pDNA komplekside transfektsioon *in vivo* tingimustes

Järgmisena uuriti, kas eelnevalt rakukultuuris efektiivselt transfekteenud nanokompleksid on ka *in vivo* tingimustes efektiivsed geeniekspressiooni indutseerimisel. Kompleksid valmistati lanegu suhtel 4 (N/P4) ning arvestati sama (20 µg) pDNA kogusega, millest tulenevalt varieerus peptiidi kogus. PF14-O puhul oli vaja kasutada ligikaudu 1,4 korda vähem peptiidi, et valmistada sama pDNA doosi sisaldav kompleks. Tulemustest selgus, et modifitseeritud peptiidid transfekteenisid kopsu, kus PF14 ja C22-PF14 tasemed olid võrreldavad (joonis 14A). Ka PF14-O oli võimeline kopsu transfekteenima, kuid märgatavalt vähem kui PF14. Kõige efektiivsem transportvektor oli C22-PF14-O, mille puhul ekspresseeritavad lutsiferaasi tasemed oli võrreldavad JetPEIga. Samuti oli C22-PF14-O JetPEIga samal tasemel põrnas ja maksas. Maksas olid efektiivsed ka PF14 ja analoogid, millel oli laengut või hüdrofoobsust suurendatud. Analooigid, millel laengut või rasvhappe jäägi pikkust oli lühendatud, ei olnud *in vivo* tingimustes efektiivsed. Antud katses ilmnesisid endiselt kõrvaltoimed PF14 ja C22-PF14-O komplekside manustamise korral (tabel 4).

Viimaseks kombineeriti töö esimeses osas saadud kompleksi optimeeritud formulatsioon ning kasutati kõrgemat pDNA kontsentratsiooni madalama N/P suhte juures ja töö teises osas sünteesitud PF14 analoogid, mis olid efektiivsed *in vivo* tingimustes. Kompleksides kasutati 50 µg plasmidi ning kompleksid valmistati N/P2 juures. Bioaktiivsus suurenes maksas PF14 analoogidel ning kõige efektiivsem oli C22-PF14-O (joonis 14B). Kasutades optimeeritud formulatsiooni vähenes kopsu transfektsioon ning PF14, mis põhjustas maksas kõige vähem bioaktiivsust, oli kõige efektiivsem kopsu transfekteenimisel. Optimeeritud formulatsiooni kasutamisel kadusid kõrvaltoimed (tabel 4).

Tabel 4. PF14 ja C22-PF14-O letaalsuste arv.

	N	Letaalsuste arv
PF14 N/P4 20 µg	12	2
PF14 N/P2 50 µg	19	0
C22-PF14-O N/P4 20 µg	14	2
C22-PF14-O N/P2 50 µg	5	0



Joonis 14. PF14 analoogide transfektsioon in vivo tingimustes. A – in vivo indutseeritud geeniekspressioon N/P4 kompleksidega, kus on kasutusel 20 µg pDNA. B -optimeeritud formulatsiooniga N/P2 50 µg pDNA indutseeritud geeniekspressioon

Arutelu

Üheks potentsiaalseks võimaluseks mitmete haiguste ravil on geeniteraapia. Seni ei ole geeniteraapia laialt levinud aga mitmete piirangute tõttu, kuna nukleiinhapete transport rakkudesse on ebaefektiivne või põhjustavad kasutatavad transportvektorid immuunreaktsiooni (Collins ja Thrasher, 2015). Nende väljakutsete ületamiseks on vaja luua efektiivsemaid ja ohutumaid transportvektoreid.

Üheks võimaluseks on nukleiinhappeid rakkudesse transportida RSPdega, mis on mitte-viraalsed vektorid ning on efektiivsed nii *in vitro* kui *in vivo* tingimustes. RSPsid on võimalik disainida ja modifitseerida keemilise sünteesi abil ning seetõttu võivad need vektorid olla väga varieeruvad laengute ja hüdrofoobsuse poolest ning pakuvad võimalust transportida erinevaid nukleiinhappeid ning transfekteerida erinevaid rakutüüpe ja organeid (Milletti 2012).

Tekkivate nanopartiklite suurus mängib eriti olulist rolli *in vivo* tingimustes, sest alla 10 nm suurused partiklid elimineeritakse neerudes ning partiklid, mille diameeter on suurem kui 150 nm, on raskendatud difusiooniga ekstratsellulaarses ruumis ning ei pruugi olla suutelised vereringest väljuma (Blanco *et al.*, 2015). Käesolevas töös nägime, et PF14/pDNA moodustunud komplekside hüdrodünaamiline läbimõõt sõltub kasutatavast N/P suhtest. Eelnevalt on näidatud, et efektiivseks transfektsiooniks sobib N/P4 ning antud kompleksi diameeter on ~100 nm, mis vastab sobivatele tingimustele *in vivo* manustamisel. Samas on näidatud, et need nanopartiklid põhjustavad kõrvaltoimeid, millega kaasneb osade hiirte surm (Veiman *et al.*, 2015). Seetõttu oli antud magistritöö üheks eesmärgiks välja töötada sama efektiivne, kuid kõrvaltoimeteta nanopartikli formulatsioon. Selleks iseloomustati ja optimeeriti töö esimeses osas PF14/pDNA komplekside moodustamise tingimusi. Tulemused näitavad, et madalamatel laengusuhetel partikli diameeter kasvab, kuid langeb zeta potentsiaal. Need omadused võivad tuleneda nõrgematest interaktsioonidest pDNA ja RSP vahel ja/või väiksemast tõukumisest neutraalsete partiklite vahel madala N/P korral.

Nanopartikkel peaks olema positiivse pinnalaenguga, et toimuks interaktsioonid rakumembraaniga, millel on omakorda negatiivne laeng. Samas põhjustab positiivne pinnalaeng nanopartiklitele kinnituvate opsoniinide hulka läbi elektrostaatilise, ionsete, van der Waalsi ja teiste jõudude. Kuna opsonisatsioon võib põhjustada kehas immuunreaktsiooni teket, siis selle vältimiseks peaksid nanopartiklid olema neutraalse pinnalaenguga ning minimaalselt opsoniseeritud (Owens III ja Peppas, 2006). DLS analüüsi käigus selgus, et N/P4

ja N/P2 kompleksidel on sarnane suurus ning zeta potentsiaal, kuid SDS-PAGE tulemused näitasid, et N/P2 komplekse opsoniseeriti oluliselt vähem, seega valiti nimetatud formulatsioon välja kasutamiseks järgnevatel katsetel.

Uut formulatsiooni katsetati rakukultuuris, kus selgus, et rakkude elumusele avaldab mõju N/P suhe, mitte pDNA doos. Antud tulemused inspireerisid samasuguse lähenemise kasutamist ka loomudel. Kuna oli oluline leida N/P suhe ja formulatsioon, mis ei põhjustaks *in vivo* kõrvaltoimeid, kuid püsiks efektiivne, uuriti võimalust vähendada peptiidi kogust kompleksis, optimeerides kasutatava pDNA kogust kompleksi valmistamisel. Selgus, et kasutades kõrgemat pDNA doosi madalamal N/P suhtel võib *in vivo* transfektsioon olla sama efektiivne kui madalama pDNA doosi ja kõrge N/P suhte juures. Näiteks andis N/P4 kompleks, milles oli 20 µg plasmidi, samasuguse bioloogilise efekti kui N/P2 kompleks, kus oli kasutatud 50 µg plasmidi. Kusjuures N/P2 suhtel valmistatud kompleksid ei põhjustanud loomadel kõrvaltoimeid ega mõjunud ühelegi hiirele surmavalt. Selle põhjus võib olla N/P2 kompleksi madalam opsoniseerimine, mis vähendab immuunreaktsioonide teket.

Töö teiseks eesmärgiks oli uurida peptiidi laengu ja hüdrofoobsuse olulisust pDNA transfektsioonil ja optimeerides neid omadusi disainida veelgi efektiivsem transportvektor. Antud töö teises etapis sünteesiti PF14 analoogid, kus oli modifitseeritud RSP laengut või rasvhappe jäägi pikkust. Esimeses osas tehtud rakukultuuri transfektsiooni katse põhjal oli eesmärgiks kasutada madalamat N/P suhet ning RSP laengu suurendamisel on võimalik kasutada vähem peptiidi kompleksi moodustamisel. Selleks loodi PF14-O, mis võimaldas vähendada kasutatavat RSP hulka, kuid säilis efektiivne transfektsioon *in vitro* tingimustes. Lisaks jäid nimetatud analoogiga moodustatud kompleksi diameeter kui ka pinnalaeng samaks võrreldes PF14 nanopartiklitega. Samas PF14-E, mille füüsikokeemilised omadused on samad, kuid RSP laeng on väiksem kui PF14 puhul, on vähem efektiivne transfektsioonil.

RSP hüdrofoobsuse mõjutamiseks on kasutatatud rasvhappe jäägi lisamist peptiidi järjestusele. Eelnevalt on näidatud, et mida pikem on PF14 järjestusele lisatud alküülrühm, seda efektiivsemalt transporditakse spleenist korregeerivaid oligonukleotiidide rakkudesse. See võib tuleneda moodustunud komplekside suurenenud seondumisest rakumembraaniga, mida põhjustavad hüdrofoobsed jõud kompleksi ja rakumembraani vahel (Lehto *et al.*, 2017). Antud töös testiti, kas sama olukord kehtib ka pDNA transpordil rakkudesse ning *in vivo* tingimustes. Selleks mõõdeti kõigepealt partiklite diameetrit ja pinnalaengut ning leiti, et lühem süsivesinikahel moodustas väiksema kompleksi ja oli madalama pinnalaenguga. Lühendatud

rasvhappe jäägiga kompleksid transfekeerivad rakke väiksema efektiivsusega, mis võib tuleneda vähenenud hüdrofoobsetest ja elektrostaatilistest interaktsioonidest nanopartikli ja rakumembraani vahel.

Kompleksid peavad olema stabiilsed ja vastupidavad, et neid saaks kasutada transfekeerimiseks, eriti *in vivo* tingimustes, kus esineb erinevaid lagundavaid ensüüme. Töödeldes komplekse proteinaas K-ga hinnati moodustatud komplekside stabiilsust ja degradatsiooni. Nanopartiklite stabiilsust võivad põhjustada erinevad aspektid. Üheks põhjuseks võib olla kompleksi kondensatsioon ehk kui tugevasti ja efektiivselt on RSP ja pDNA omavahel seondunud. Tugeva seondumise korral ei pääse ensüüm peptiidile ligi, et seda lagundada. Tulemustest selgus, et mida hüdrofoobsem ja suurema summaarse laenguga on peptiid, seda vastupidavamad on kompleksid ensümaatilisele lagundamisele. Kui võrrelda saadud tulemust *in vitro* transfektsiooniga, võib üldiselt järeldada, et mida suurem on kompleksi stabiilsus, seda kõrgem on transfektsiooni efektiivsus.

Järgmiseks uuriti, kas *in vitro* tingimustes tehtud katsete põhjal saadud järeldused kehtivad ka *in vivo* tingimustes. Selgus, et komplekside stabiilsus mängib olulist rolli ka hiire kudede transfekeerimisel, kusjuures kõige efektiivsem peptiidid transfektsiooniks oli C22-PF14-O, mille efektiivsus oli samas suurusjärgus kommertsiaalse *in vivo* reagenti JetPEI-ga.

Viimases etapis kombineeriti töö eelmistes osades saadud võtmetulemused ehk kasutati modifitseeritud PF14 efektiivsemaid analooge optimeeritud formulatsiooni tingimustes *in vivo*. Tulemused kinnitavad eelnevalt püstitatud hüpoteesi, et optimeeritud formulatsiooni kasutades väheneb nanopartiklite opsonisatsioon ning seetõttu väheneb kopsu transfektsioon, esineb vähem kõrvaltoimeid ja pDNA transporditakse eelistatult maksa.

Antud töös käsitletud termin „kõrvaltoimeid“ esitab ebasoovitavaid toimeid kitsendatult, sest vaadatakse vaid loomade suremust. Tuleb mainida, et praegune töö on osa suuremast projektist, mis sisaldab lisaks muid analüüse, nagu kliinilist verekeemiat ja pato-histoloogiat, mis on osaliselt väljaselgitamisel ja jäeti antud tööst välja. Seega on antud töö kontekstis hinnatud vaid väikeste grupi suuruste põhjal suremuse vähenemist. Tabel 4 esitatud valimisse kuulub andmeid ka teistest eksperimentidest.

Kokkuvõttes optimeeriti nanopartiklite formulatsiooni, mille tulemusel vähenes nanopartiklite opsonisatsioon ning kadusid negatiivsed kõrvaltoimed *in vivo* kasutamisel. Lisaks sünteesiti pDNA efektiivsemaks transpordiks modifitseeritud PF14 järjestused ning

stabiilseid nanopartikleid moodustavad peptiidid, millel oli suurendatud summaarset laengut ja/või hüdrofoobsust, suutsid indutseerida efektiivse geeniekspressiooni ka loommudelites. Kombineerides optimeeritud formulatsiooni suurenenud hüdrofoobsuse ja summaarse laenguga RSPga välditi samuti kõrvalmõjusid ning vähendati kopsu ja suurendati maksa transfektsiooni, mis annab edaspidi võimaluse maksaspetsiifiliseks geeniteraapiaks.

Kokkuvõte

Geeniteraapia abil on võimalik ravida haigusi, toimetades terapeutilise toimega nukleiinhappeid rakkudesse. Biomolekulide rakkude viimiseks on loodud transportvektorid, mis jagunevad viraalseteks ja mitte-viraalseteks vektoriteks. Geeniteraapias transportvektorite kasutamisel tuleb leida ohutud/turvalised ja efektiivsed transportvektorid.

Antud töös uuriti pDNA transpordiks kasutatava rakku siseneva peptiidi (RSP), PepFect14 (PF14), füsikoemilisi omadusi, mis võivad olla seotud kõrvaltoimetega loomudelites. Töös optimeeriti nanopartiklite formulatsiooni ning saavutati efektiivne geeniekspressioon ilma kõrvaltoimeteta. Lisaks sellele modifitseeriti PF14 järjestust ning sünteesiti analoogid, kus oli muudetud peptiidi summaarset laengut või rasvhappe jäägi pikkust, et saavutada efektiivsem transportvektor. Kombineerides suurenenud summaarne laeng ning hüdrofoobsus peptiidi C22-PF14-O, oli võimalik vähendada kasutatava peptiidi hulka kompleksis ning indutseerida geeniekspressiooni nii maksas kui kopsus ilma kõrvaltoimeid põhjustamata.

Efficient gene induction with reduced toxicity *in vivo* can be achieved by charge and fatty acid modified PepFect14

Elin Madli Peets

Summary

Non-viral gene delivery systems have gained much attention as a promising alternative to viral gene delivery to treat diseases associated with aberrant gene expression. However, regardless of extensive research, little is known about the parameters that underline *in vivo* use of nanoparticle-based delivery vectors. The two main issues that need to be addressed are low efficacy and low safety. PepFect14 has previously been characterized as an efficient cell penetrating peptide for *in vivo* applications. In the current work, we first developed an optimized formulation of PF14/pDNA, which allowed removal of side-effects without compromising the bioefficacy *in vivo*. Secondly, based on the physicochemical complex formation studies and biological efficacy assessments, we have developed a series of modified PF14 analogs with altered charge and fatty acid content. We show that with an optimal combination of overall charge and hydrophobicity in the peptide sequence and optimized formulations, more efficient *in vivo* gene delivery can be achieved with improved *in vivo* pDNA delivery efficacy and reduced side effects.

Tänuõnad

Soovin tänada oma juhendajaid Kaido Kurrikoffi ja Kadi-Liis Veimani, kes suunasid ja aitasid töö kirjutamisel. Lisaks soovin tänada molekulaarse biotehnoloogia laborit, kes toetasid jõu, nõu ja šokolaadiga kellaajast sõltumatult, eriti Ly Pärnaste ja Kristina Kiisholts. Suur tänu Eva Asperile motivatsiooni eest.

Kasutatud kirjanduse loetelu

- Akinc, A., Thomas, M., Klivanov, A.M., and Langer, R. (2005). Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J. Gene Med.* 7, 657–663.
- Arick, D.Q., Choi, Y.H., Kim, H.C., and Won, Y.-Y. (2015). Effects of nanoparticles on the mechanical functioning of the lung. *Adv Colloid Interface Sci* 225, 218–228.
- Bartfai, T., Hökfelt, T., and Langel, U. (1993). Galanin--a neuroendocrine peptide. *Crit Rev Neurobiol* 7, 229–274.
- Beddoes, C.M., Case, C.P., and Briscoe, W.H. (2015). Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Adv Colloid Interface Sci* 218, 48–68.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* 235, 337–351.
- Blanco, E., Shen, H., and Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* 33, 941–951.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7297–7301.
- Cheng, Z., Al Zaki, A., Hui, J.Z., Muzykantov, V.R., and Tsourkas, A. (2012). Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. *Science* 338, 903–910.
- Collins, M., and Thrasher, A. (2015). Gene therapy: progress and predictions. *Proc Biol Sci* 282.
- Cullis, P.R., and Hope, M.J. (2017). Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Molecular Therapy* 0.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 10444–10450.
- Desai, N. (2012). Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. *AAPS J* 14, 282–295.

- Duan, X., and Li, Y. (2013). Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. *Small* 9, 1521–1532.
- Ezzat, K., EL Andaloussi, S., Zaghloul, E.M., Lehto, T., Lindberg, S., Moreno, P.M.D., Viola, J.R., Magdy, T., Abdo, R., Guterstam, P., et al. (2011). PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Res* 39, 5284–5298.
- Ezzat, K., Helmfors, H., Tudoran, O., Juks, C., Lindberg, S., Padari, K., El-Andaloussi, S., Pooga, M., and Langel, U. (2012). Scavenger receptor-mediated uptake of cell-penetrating peptide nanocomplexes with oligonucleotides. *FASEB J.* 26, 1172–1180.
- Frankel, A.D., and Pabo, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189–1193.
- Gao, C., Mao, S., Ditzel, H.J., Farnes, L., Wirsching, P., Lerner, R.A., and Janda, K.D. (2002). A cell-penetrating peptide from a novel pVII–pIX phage-displayed random peptide library. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10, 4057–4065.
- Gary, D.J., Min, J., Kim, Y., Park, K., and Won, Y.-Y. (2013). The effect of N/P ratio on the in vitro and in vivo interaction properties of PEGylated poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-based siRNA complexes. *Macromol Biosci* 13, 1059–1071.
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., and Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69, 1–9.
- Green, M., and Loewenstein, P.M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55, 1179–1188.
- Grund, S., Bauer, M., and Fischer, D. (2011). Polymers in Drug Delivery—State of the Art and Future Trends. *Adv. Eng. Mater.* 13, B61–B87.
- Guidotti, G., Brambilla, L., and Rossi, D. (2017). Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends in Pharmacological Sciences* 38, 406–424.
- Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T., and Ross, E.M. (1988). Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J. Biol. Chem.* 263, 6491–6494.

- Hitz, T., Iten, R., Gardiner, J., Namoto, K., Walde, P., and Seebach, D. (2006). Interaction of α - and β -Oligoarginine-Acids and Amides with Anionic Lipid Vesicles: A Mechanistic and Thermodynamic Study. *Biochemistry* 45, 5817–5829.
- Ibraheem, D., Elaissari, A., and Fessi, H. (2014). Gene therapy and DNA delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* 459, 70–83.
- Jiang, T., Olson, E.S., Nguyen, Q.T., Roy, M., Jennings, P.A., and Tsien, R.Y. (2004). Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. *PNAS* 101, 17867–17872.
- Jimenez, M.S., Luque-Alled, J.M., Gomez, T., and Castillo, J.R. (2016). Evaluation of agarose gel electrophoresis for characterization of silver nanoparticles in industrial products. *Electrophoresis* 37, 1376–1383.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *PNAS* 88, 1864–1868.
- Juks, C., Padari, K., Margus, H., Kriiska, A., Etverk, I., Arukuusk, P., Koppel, K., Ezzat, K., Langel, Ü., and Pooga, M. (2015). The role of endocytosis in the uptake and intracellular trafficking of PepFect14-nucleic acid nanocomplexes via class A scavenger receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1848, 3205–3216.
- Junquera, E., and Aicart, E. (2016). Recent progress in gene therapy to deliver nucleic acids with multivalent cationic vectors. *Advances in Colloid and Interface Science* 233, 161–175.
- Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F.M., and Jones, A. (2010). High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 368, 4439–4451.
- Kathe, N., Henriksen, B., and Chauhan, H. (2014). Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. *Drug Dev Ind Pharm* 40, 1565–1575.
- Koren, E., and Torchilin, V.P. (2012). Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends Mol Med* 18, 385–393.

- Kotterman, M.A., and Schaffer, D.V. (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet* 15, 445–451.
- Kurrikoff, K., Suhorut, J., and Langel, Ü. (2011). Cell-Penetrating Peptides in Cancer Targeting. In *Drug Delivery in Oncology*, F. Kratz, P. Senter, and H. Steinhagen, eds. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 1187–1217.
- Kurrikoff, K., Gestin, M., and Langel, Ü. (2016). Recent in vivo advances in cell-penetrating peptide-assisted drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 13, 373–387.
- Lamprecht, C., Hinterdorfer, P., and Ebner, A. (2014). Applications of biosensing atomic force microscopy in monitoring drug and nanoparticle delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 11, 1237–1253.
- Lane, D., Prentki, P., and Chandler, M. (1992). Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol Rev* 56, 509–528.
- Langel, K., Lindberg, S., Copolovici, D., Arukuusk, P., Sillard, R., and Langel, Ü. (2010). Novel Fatty Acid Modifications of Transportan 10. *Int J Pept Res Ther* 16, 247–255.
- Lehto, T., Vasconcelos, L., Margus, H., Figueroa, R., Pooga, M., Hällbrink, M., and Langel, Ü. (2017). Saturated Fatty Acid Analogues of Cell-Penetrating Peptide PepFect14: Role of Fatty Acid Modification in Complexation and Delivery of Splice-Correcting Oligonucleotides. *Bioconjugate Chem.* 28, 782–792.
- Lo, S.L., and Wang, S. (2008). An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection. *Biomaterials* 29, 2408–2414.
- Lukashev, A.N., and Zamyatnin, A.A. (2016). Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochemistry Mosc.* 81, 700–708.
- Mäe, M., El Andaloussi, S., Lundin, P., Oskolkov, N., Johansson, H.J., Guterstam, P., and Langel, U. (2009). A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release* 134, 221–227.
- Margus, H., Padari, K., and Pooga, M. (2012). Cell-penetrating Peptides as Versatile Vehicles for Oligonucleotide Delivery. *Mol Ther* 20, 525–533.

- Margus, H., Arukuusk, P., Langel, Ü., and Pooga, M. (2016). Characteristics of Cell-Penetrating Peptide/Nucleic Acid Nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics* *13*, 172–179.
- Marks, J.R., Placone, J., Hristova, K., and Wimley, W.C. (2011). Spontaneous Membrane-Translocating Peptides by Orthogonal High-Throughput Screening. *J. Am. Chem. Soc.* *133*, 8995–9004.
- Mehier-Humbert, S., and Guy, R.H. (2005). Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *57*, 733–753.
- Milletti, F. (2012). Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discovery Today* *17*, 850–860.
- Morris, M.C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F., and Divita, G. (1997). A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* *25*, 2730–2736.
- Morris, M.C., Deshayes, S., Heitz, F., and Divita, G. (2008). Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biology of the Cell* *100*, 201–217.
- Mueller, J., Kretzschmar, I., Volkmer, R., and Boisguerin, P. (2008). Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines. *Bioconjug. Chem.* *19*, 2363–2374.
- Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature* *526*, 351–360.
- Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschen, E., Melzig, M., and Bienert, M. (1998). Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* *1414*, 127–139.
- Owens, D.E., and Peppas, N.A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* *307*, 93–102.
- Pack, D.W., Hoffman, A.S., Pun, S., and Stayton, P.S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov* *4*, 581–593.
- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., and Langel, U. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J.* *12*, 67–77.

- Ramsay, E., and Gumbleton, M. (2002). Polylysine and polyornithine gene transfer complexes: a study of complex stability and cellular uptake as a basis for their differential in-vitro transfection efficiency. *J Drug Target* 10, 1–9.
- Salatin, S., Maleki Dizaj, S., and Yari Khosroushahi, A. (2015). Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles. *Cell Biol. Int.* 39, 881–890.
- Schlenk, F., Grund, S., and Fischer, D. (2012). Recent developments and perspectives on gene therapy using synthetic vectors. *Therapeutic Delivery* 4, 95–113.
- Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hällbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R., and Langel, Ü. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1467, 165–176.
- Stewart, M.P., Sharei, A., Ding, X., Sahay, G., Langer, R., and Jensen, K.F. (2016). In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery. *Nature* 538, 183–192.
- Treuel, L., Eslahian, K.A., Docter, D., Lang, T., Zellner, R., Nienhaus, K., Nienhaus, G.U., Stauber, R.H., and Maskos, M. (2014). Physicochemical characterization of nanoparticles and their behavior in the biological environment. *Phys Chem Chem Phys* 16, 15053–15067.
- Vannucci, L., Lai, M., Chiappesi, F., Ceccherini-Nelli, L., and Pistello, M. (2013). Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* 36, 1–22.
- Veiman, K.-L., Mäger, I., Ezzat, K., Margus, H., Lehto, T., Langel, K., Kurrikoff, K., Arukuusk, P., Suhorutšenko, J., Padari, K., et al. (2013). PepFect14 peptide vector for efficient gene delivery in cell cultures. *Mol. Pharm.* 10, 199–210.
- Veiman, K.-L., Künnapuu, K., Lehto, T., Kiisholts, K., Pärn, K., Langel, Ü., and Kurrikoff, K. (2015). PEG shielded MMP sensitive CPPs for efficient and tumor specific gene delivery in vivo. *J Control Release* 209, 238–247.
- Vivès, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997). A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* 272, 16010–16017.
- Wang, D., and Gao, G. (2014). State-of-the-art human gene therapy: part I. Gene delivery technologies. *Discov Med* 18, 67–77.

- Wang, T., Upponi, J.R., and Torchilin, V.P. (2012). Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: Dilemmas and strategies. *International Journal of Pharmaceutics* 427, 3–20.
- Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L., and Rothbard, J.B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13003–13008.
- Xu, Y., and Szoka, F.C. (1996). Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection,. *Biochemistry* 35, 5616–5623.
- Yang, J., Liu, H., and Zhang, X. (2014). Design, preparation and application of nucleic acid delivery carriers. *Biotechnology Advances* 32, 804–817.
- Ye, J., Liu, E., Yu, Z., Pei, X., Chen, S., Zhang, P., Shin, M.-C., Gong, J., He, H., and Yang, V.C. (2016). CPP-Assisted Intracellular Drug Delivery, What Is Next? *Int J Mol Sci* 17.
- Yin, H., Kanasty, R.L., Eltoukhy, A.A., Vegas, A.J., Dorkin, J.R., and Anderson, D.G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet* 15, 541–555.
- Ziegler, A. (2008). Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 580–597.

Kasutatud veebiaadressid

<http://www.polyplus-transfection.com/products/in-vivo-jetpei> (24.05.2017)

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Elin Madli Peets

(sünnikuupäev: 09.07.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
"Optimeeritud laengu ja hüdrofoobsusega PepFect14 võimaldab parandada geenitransporti ja vähendada kõrvaltoimeid"

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on Kadi-Liis Veiman ja Kaido Kurrikoff,

(juhendaja nimi)

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **31.05.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 31.05.2017 (*kuupäev*)